

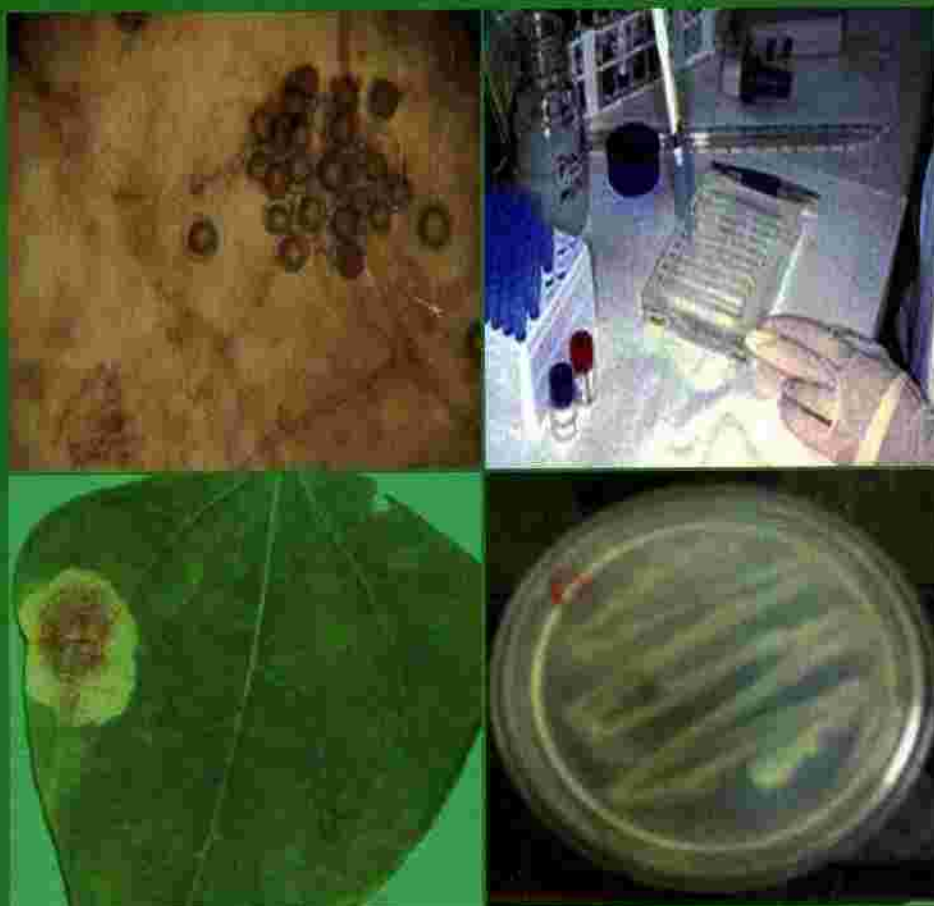
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

Facultad de Agronomía

Departamento de Protección Agrícola y Forestal

MÓDULO PRÁCTICO

TÉCNICAS DE LABORATORIO



Compendio de guías

Autor

MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán

Managua, Septiembre 2012



*"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"*

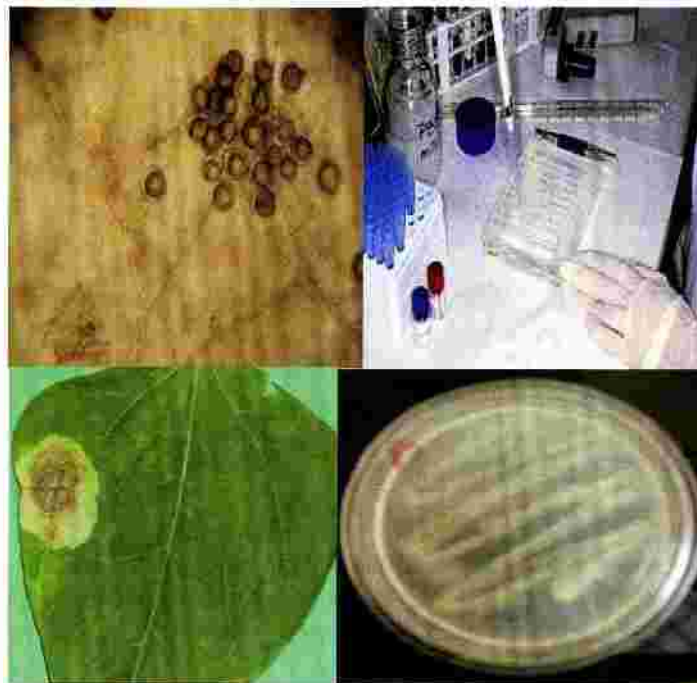
Universidad Nacional Agraria

Facultad de Agronomía

Departamento de Protección Agrícola y Forestal

MÓDULO PRÁCTICO

Técnicas de laboratorio



Compendio de guías

Autor

MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán

Managua, Septiembre 2012

Universidad Nacional Agraria

Facultad de Agronomía

Departamento de Protección Agrícola y Forestal

Créditos

Contenido Técnico: MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán

Coordinación: MSc. Víctor Sandino
Ing. Ma. Gabriela Zapata

Revisión técnica:

PROMIPAC: MSc. Julio López
Ma. Gabriela Zapata.

UNA: MSc. Víctor Sandino

Arte y Diseño: Ing. Harold Argüello
Ing. Ma. Gabriela Zapata
Lic. Karol Contreras

Fotografías: UNA

Septiembre 2012

Agradecimiento: La coordinación agradece, la ardua labor realizada por el personal docente del DPAF-UNA y PROMIPAC en el desarrollo y revisión de este material que vendrá a ser de mucha utilidad para los docentes y estudiantes de toda índole que estén relacionados con dicho expertis.

Esta publicación ha sido posible gracias al apoyo del Programa de Manejo Integrado de Plagas en América Central (PROMIPAC) y al patrocinio de la Cooperación Suiza en América Central.

© DERECHOS RESERVADOS

2012 Universidad Nacional Agraria (UNA); Programa de Manejo Integrado de Plagas en América Central (PROMIPAC-ZAMORANO). Se autoriza la reproducción total o parcial de esta obra con fines educativos y no de lucro; sólo se requiere citar la fuente.

Gutiérrez Y. 2012. Universidad Nacional Agraria MÓDULO PRÁCTICO: Técnicas de laboratorio. Managua, Nicaragua. 1º Edición, 2012. 61p.

Técnicas de Laboratorio

	INDICE DE CONTENIDO	PÁGINA
	PRESENTACION	4
	GUÍA 1. Organización, estructura y trabajo aséptico de laboratorio	5
	GUÍA 2. Preparación de medios de cultivos ó nutritivos	10
	GUÍA 3. Técnicas de aislamiento de Oomycetes y Hongos fitopatógenos	12
	GUÍA 4. Técnicas de aislamiento de Bacterias fitopatógenas	14
	GUÍA 5. Técnicas de extracción de Nematodos de suelo y material vegetal	17
	GUÍA 6. Evaluación de sanidad de la semilla	20
	GUÍA 7. Técnicas de inoculación de Bacterias y Hongos fitopatógenos	23
	GUÍA 8. Técnica Elisa para la determinación de presencia de Virus fitopatógenos	27
	GUÍA 9. Técnicas de aislamiento de Hongo Entomopatógenos	30
	GUÍA 10. Calibración de microscopio	33
	GUÍA 11. Determinación de concentración de esporas o propágulos mediante el Hemacitómetro	36
	GUÍA 12. Organización y principios de trabajo con técnicas moleculares	40

Técnicas de Laboratorio

ANEXO	INDICE DE ANEXO	PÁGINA
1	Anexo 1. Trabajo aséptico de laboratorio	44
2	Anexo 2. Receta de medios de cultivos ó nutritivos	46
3	Anexo 3. Técnicas de aislamiento de <i>Oomycetes</i> y hongos Fitopatógenos	50
4	Anexo 4. Técnicas de aislamiento de bacterias fitopatógenas	54
5	Anexo 5. Técnicas de extracción de nematodos de suelo y material vegetal	55
6	Anexo 6. Evaluación de Sanidad de semillas	58
7	Anexo 7. Técnicas ELISA para detección de Virus fitopatógenos	59
8	Anexo 8. Organización y principios de trabajo de laboratorio con técnicas moleculares	59

PRESENTACIÓN

La Universidad Nacional Agraria, (UNA), institución de educación superior que contribuye al desarrollo agrario, mediante la formación de profesionales y el Programa de Manejo Integrado de Plagas en América Central PROMIPAC, cuyo objetivo es fortalecer la capacidad de instituciones agropecuarias en Centroamérica, ambas instituciones en pro de potencializar las capacidades nacionales y comprometidas con el desarrollo social y productivo del país, hacen posible la publicación del presente Compendio de Guías de Técnicas de Laboratorio.

Con el compromiso de fortalecer las capacidades técnicas de futuros profesionales y sector agropecuario en general, el Compendio de Guías de Técnicas de Laboratorio, provee de herramientas para el diagnóstico de enfermedades en plantas a nivel de laboratorio y práctica de invernadero; están orientadas en una secuencia, que describen protocolos prácticos, sencillos y de esta forma desarrollar habilidades y destrezas en los estudiantes, además de brindar contenidos técnicos-científicos aplicados en investigación concerniente a la fitopatología y en el ámbito de la fitoprotección.

MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán
Docente investigador DPAF-UNA

GUÍA 1. ORGANIZACIÓN, ESTRUCTURA Y TRABAJO ASÉPTICO DE LABORATORIO

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Utilizar equipos, instrumentos, cristalería y principios del trabajo aséptico en laboratorio de diagnóstico en enfermedades de plantas.

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCIÓN

Según el trabajo que se realiza existen diversos tipos de laboratorios: clínico-diagnóstico; sanitario-epidemiológico; laboratorios para controlar la elaboración de preparados bacterianos (antibióticos, vitaminas, productos de leche, pan, cerveza etc.).

En Universidades y Centros Agropecuarias existen laboratorios microbiológicos, entomológicos, biología molecular, en estos se estudian el papel e importancia de ciertas especies de microorganismos en la transformación de sustancias, en la formación de la estructura y fertilidad del suelo, en la nutrición de las plantas, etcétera. En los laboratorios de patología vegetal, se estudian y se identifican los agentes causales de enfermedades que afectan a las plantas y la diversidad de especies y si bien en cada laboratorio se lleva a cabo actividades e investigaciones específicas, los métodos y principios que se utilizan en estos son similares.

II. OBJETIVOS

- Manipular equipos, instrumentos, reactivos, cristalería más comunes en el laboratorio
- Diferenciarlos métodos de esterilización, desinfección, quema y flameo de cristalería, instrumentos y otros equipos
- Diferenciar la organización de trabajo de laboratorio de diagnóstico de enfermedades en plantas
- Nombrar instrumentos y cristalería y requerimiento de asepsia (esterilización, desinfección, flameado, quema)

Técnicas de Laboratorio

III. MATERIALES

Cristalería: Erlenmeyer, tubos de ensayos, pipetas, platos petri, probetas, agitadores, papel de envolver, platos petri con medio general de bacterias, algodón, cloro, alcohol 95 %

Equipos: centrífuga, micro pipetas, cámara de flujo laminar, autoclave, horno, microscopio, balanza mecánica, asas, mechero, bisturí, tijera, pincho espátula, vidrio reloj, porta objeto, cubre objeto, pinzas, picetas, fósforo

IV. METODOLOGÍA

4.1. Normas del trabajo en el laboratorio

Los buenos resultados de un análisis en laboratorios dependen fundamentalmente de las medidas de asepsia con que éstas se realicen, ya que el medio ambiente contiene una gran cantidad de microorganismos que pueden contaminar los cultivos puros o medios nutritivos. Con esta finalidad hay que tener presente las reglas de seguridad personal, para el trabajo en laboratorios:

1. Trabajar en el laboratorio con ropa especial (bata, gorro, mascarilla, guantes)
2. No comer, beber o fumar durante el trabajo
3. Trabajar guardando la limpieza, organización y silencio
4. El área de trabajo debe estar desinfectada antes y después
5. Lavar las manos con agua y jabón las manos al iniciar y terminar el trabajo
6. En la mesa de trabajo debe estar sólo material necesario
7. Cultivos de microorganismos usados deben ser colocados en lugar determinado para este fin
8. Rotular los tubos y platos Petri con medio de cultivo (fecha, microorganismo, investigador)
9. Mantener el microscopio y otros equipos limpios y en buen estado
10. En caso de cualquier accidente (quemadura, derramamiento de microorganismos, etc), avisar inmediatamente al profesor, para solucionar el problema
11. Prohibido sacar del laboratorio cualquier material contaminado sin haber obtenido instrucciones especiales

4.2. Organización del laboratorio

La organización básica de un laboratorio tiene que contener los siguientes cuartos o secciones de trabajo: lavadero (cuarto de lavado), cuarto de autoclave, cuarto para preparación de los medios de cultivos, cuarto de pesado, cuarto de cámara

Técnicas de Laboratorio

de flujo laminar, cuarto de centrifugación, cuarto frío, de destilación de agua y otras dependencias de acuerdo al tipo de investigación que se realice.

4.3. Cristalería que se utiliza ampliamente en laboratorios

Erlenmeyer graduados, tubos de ensayo, probetas (cilindro), Becker (vaso), pipeta, pipeta Pasteur, micro pipetas, agitadores, platos Petri, porta y cubre objetos, vidrio reloj

4.4. Esterilización y desinfección

Esterilización es el proceso mediante el cual se matan o eliminan todos los microorganismos o sus órganos reproductores. Desinfectar es la eliminación o neutralización de microorganismos para evitar una infección o avance de los mismos.

Flamear y quemar, la aguja de transferencia y asa son hechas de cromoníquel entonces pueden ser quemadas en la llama de un mechero al rojo vivo. Después se les moja en alcohol etílico 96% (para su enfriamiento)

ACTIVIDADES

- Organizarse en grupos de 4 estudiantes
- Realizar lectura de las reglas de trabajo del laboratorio
- Diferenciar la organización de laboratorio de prácticas, con explicación del instructor; en grupo de trabajo recorre las diferentes instalaciones
- Limpiar su mesa de trabajo con hipoclorito 10 %
- Preparar la cristalería (tubos de ensayo, pipetas, platos petri erlenmeyer), para su esterilización
- Observar e indagar el funcionamiento de autoclave, centrífuga, destilador, cámara de flujo laminar
- Practicar el rayado simple de bacterias, cumpliendo con las medidas de asepsia, esterilizar y desinfectar, el profesor realizará la demostración
- Completar la Tabla 1 y marque con una X cuáles instrumentos se flamean, cuáles se esterilizan y cuáles se desinfectan, socializar y entregar al final de la práctica
- Leer lectura del Anexo 1 y contestar las preguntas de aprendizajes



Figura 1. Cámara de flujo laminar para el trabajo Aseptico de laboratorio

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJES

- ¿Por qué es indispensable trabajar en el laboratorio microbiológico con ropa especial?
- ¿Cuáles son los métodos de esterilización?
- ¿Cuál es la diferencia entre los términos de esterilización, desinfección y flameo?
- ¿Cuál es la temperatura y tiempo, para esterilizar cristalería en autoclave?
- ¿Para qué sirve el horno en el trabajo de laboratorio?
- ¿Cómo funciona la cámara de flujo laminar?
- ¿En qué trabajos y para que se utiliza la centrífuga?
- ¿Qué sustancias químicas se utilizan para desinfectar mesas y material vegetal infectado?
- ¿Cómo está organizado el laboratorio donde usted está realizando esta práctica?
- ¿Por qué es necesario el uso de agua destilada en los trabajos de laboratorio?

VI. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G.N.; 2002 Fitopatología. Academia Press University of Florida USA

FRENCH, E. Y HEBER T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA. 154-158 pp.

Técnicas de Laboratorio

APUNTES

Tabla1. Cristalería, instrumentos, equipos y materiales de laboratorio

Nombre/Cristalería /instrumento	Esterilización	Desinfección	Flameado	Quemar	Lavado

GUIA 2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS Ó NUTRITIVOS

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Preparar diferentes medios de cultivos para el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas y cumple con los pasos establecidos para su correcta preparación

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCIÓN

Para desarrollarse y multiplicarse los microorganismos deben nutrirse, es decir, deben obtener del medio ambiente todas las sustancias necesarias para la síntesis de componentes estructurales de la célula y para la obtención de energía. Por eso los medios nutritivos ó medios de cultivos tienen que contener las sustancias nutritivas necesarias en cantidades que corresponden a las necesidades específicas de un microorganismo (m.o.).

Medios de cultivos: Es un substrato o solución que permite el crecimiento de uno o más organismos.

Cultivo: Es el producto del crecimiento de un organismo o grupo de organismos establecido con fines experimentales o industriales.

Cultivo puro: Es el cultivo de un sólo organismo y su progenie. Es un cultivo clonal de un organismo libre de todo contaminante.

II. OBJETIVOS

- Clasificar los medios, para aislamiento de hongos y bacterias fitopatógenas
- Preparar de acuerdo a la secuencia de preparación de algunos medios de cultivos
- Vertir PDA en platos Petri estériles, cumpliendo las medidas de asepsia descritas

III. MATERIALES

Platos Petri esterilizado, agua destilada estéril, maskingtape, parafilm, enlermeyer de 300ml, 250 ml, biker, cuchillos, pana, agitadores, cinta de pH, probeta, balanza, agar, PDA, papas, dextrosa, agar-agar

IV. METODOLOGÍA

ACTIVIDADES

Lea cuidadosamente las instrucciones relativas a la preparación de medios de cultivos y asepsia **anexo 1 y 2** (Recetas de los medios nutritivos). En grupo de 3-4 estudiantes, preparar cuatro medios diferentes (PDA, AN, YDC, KING-B). Calcular de acuerdo a la cantidad-volumen en ml. Las recetas están descritas en cantidades para 1 000 ml.

- Preparar 250 ml de papa, dextrosa, agar (PDA) (cocción de papas)
- Preparar 150 ml de agar nutritivo (A.N.) medio general para bacterias
- Preparar 150 ml medio de cultivo King – B para *Pseudomonas*
- Preparar 200 ml medio de cultivo YDC para *Erwinia*.
- Medir el pH a cada medio de cultivo
- Esterilizar/autoclavar 120 °C por 15 min
- Responder por escrito las preguntas de aprendizaje, consultar manual Métodos de investigación fitopatológica

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJE

- ¿Cómo se clasifican los medios de cultivos (nutritivos) según su origen?
- ¿Cuál es la clasificación de los medios de cultivos según su consistencia?
- ¿Cómo se determina el pH del medio de cultivo?
- ¿Cómo se clasifican los medios nutritivos según el uso?
- ¿Cuáles son las características principales de agar y gelatina?
- ¿A qué exigencias tiene que corresponder un medio nutritivo
- ¿Por qué se utiliza el ácido láctico en el medio general de hongos (PDA)
- ¿Cuál es el pH favorable para el crecimiento de los hongos?
- ¿Cuál es el pH favorable para el crecimiento de las bacterias?
- ¿Cómo se puede saber el pH en un medio de cultivo para el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas?

VI. BIBLIOGRAFIA

FRENCH, E. Y HEBER T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA.

GUIA 3. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE OOMYCETES Y HONGOS FITOPATÓGENOS

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Practicar las diferentes técnicas de aislamiento de Oomycetes y hongos, de acuerdo al nivel de parasitismo, tejido vegetal y suelo

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCION

Los *Oomycetes* y los hongos fitopatógenos según sus hábitos alimenticios tienen diferentes grados de parasitismo (parásitos facultativos ó parásitos obligados), de ahí la importancia en el diagnóstico, el macro análisis mediante la observación al microscopio, de la muestra a procesar o diagnosticar el agente patógeno. De esta primera valoración se determina la técnica a implementarse para el aislamiento de estos patógenos de plantas.

II. OBJETIVOS

- Aplicar diferentes técnicas de aislamiento de *Oomycetes* y hongos fitopatógenos
- Aislar el patógeno, mediante la obtención de un cultivo monospórico
- Calcular en el aislamiento de dilución de suelo el número de colonias de hongos y bacterias en 10 g de suelo ó 1 g de suelo
- Preparar medio específico para *pythium* con el uso de antibioticos

III. MATERIALES

Medio de cultivo PDA (esterelizados), platos petri, tubo de ensayos estériles, agua esterilizada, agitadores, bicker 500 ml, gradillas, pipetas 1ml, algodón, hipoclorito 5%, Alcohol 95%, bisturí 5, esteroscopios, lactofenol 25%, maskingtape, marcadores, vidrio relejo, pinzas, bicker 50 ml (5), probetas de 100 ml y 10 ml, suelo, material vegetal infectado.

Técnicas de Laboratorio

IV. METODOLOGÍA

1. Trabajar grupos conformados anteriormente. Leer la descripción de las técnicas en anexo 3.
2. Aplicar las medidas de asepsia/acidificar el PDA esterilizado y verter
3. Describir y anotar los síntomas en plantas enfermas, antes de procesar las muestras
4. Sembrar en PDA el material vegetal infectado, (marchitamiento en café) utilizando la técnica (inducción al desarrollo vegetativo/micelial). Sembrar en dos platos con PDA
5. Con el suelo, aplicar la técnica de aislamiento de hongos del suelo, utilizar la dilución de 10^3 y 10^5 para hongos y bacterias dos platos petri para cada dilución
6. Observar en el estereoscopio el material vegetal infectado en cámara húmeda y aplicar la técnica de inducción a la esporulación. Sembrar en un plato por cada muestra
7. Observar y anota resultados obtenidos con ayuda del profesor
8. Realizar un cultivo monospórico (Anexo 3), para la siguiente práctica de acuerdo a resultados obtenidos
9. Calcular la Unidades formadoras de colonias según fórmula (Anexo 3)

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJE

- ¿Para qué tipos de géneros de hongos se utiliza la técnica de inducción a la esporulación?
- ¿Por qué se acidifica el PDA para aislamiento de hongos fitopatógenos?
- ¿Cuál es la técnica, para el aislamiento de hongos del suelo?
- ¿Por qué es indispensable sembrar en medio de cultivos para aislar hongos causantes de marchitez y mal del talluelo?
- ¿Para la siguiente práctica escribir resultados y entrega reporte por escrito en grupo
- ¿Por qué es importante obtener un cultivo puro originado de una sola espora? (Cultivo monospórico)

VI. BIBLIOGRAFÍA

CASTAÑO-ZAPATA, J.1986. Prácticas de laboratorio de fitopatología. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

GEORGE, G.N.; 1999. Plant Pathology Academic Press University of Florida. USA.

GILCHIRST-SAAVEDRA, L.; FUENTES –DAVILA, G.; MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-ATILANO; DUVEILLER, E.; SINGH, R.B; HENRY, M.; GARCÍA, A, s.f.

Guía práctica par la identificación de algunas enfermedades de trigo y Cebada. CYMMYT. Segunda edición.

SERGUEICHUK, M. 1986 Guía metodológica para clases prácticas de microbiología. NI. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN).

GUÍA 4.TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Practicar las diferentes técnicas de aislamiento de bacterias, de acuerdo al tipo de tejido vegetal y suelo

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las bacterias fitopatógenas son difíciles de identificar por rasgos visibles a través del microscopio, por lo que se hace necesario recurrir a ciertas técnicas como tinción, espectro nutricional, inoculaciones, serología, medios selectivos y otras pruebas específicas.

Los medios selectivos permiten el crecimiento de solo un determinado tipo de bacterias, ofreciéndole nutrientes específicos y evitando el crecimiento de todas las demás bacterias por medio de inhibidores.

El espectro nutricional de las bacterias, se establecen con base a estudios previos, donde se ha determinado cuáles compuestos pueden ser utilizados como alimento para determinado género y cuáles no. Por lo tanto al cultivar la bacteria en medios con composiciones químicas conocidas se podrá saber el tipo de crecimiento y ciertas reacciones químicas, para su identificación.

Las pruebas serológicas se han convertido en una de las técnicas más rápidas para determinar la identidad de las bacterias. En estas pruebas se utilizan diferentes sueros con anticuerpos específicos para cada una, los cuales reaccionan solo en presencia de la bacteria correspondiente. La inoculación de una bacteria desconocida en algunas especies o variedades, permite su identificación por cuanto se conoce previamente que esos hospederos específicos solo se infectan con determinadas bacterias y no con otras.

Las bacterias Gram positivas son las bacterias que se tiñen con cierto colorante (violeta cristal) y todo tan firmemente que el alcohol no las destiñe con facilidad, por el contrario, las gram negativas pierden el color por el lavado del alcohol. Son

Técnicas de Laboratorio

gram positivas los géneros *Corynebacterium* y *Streptomyces* y gram negativas *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*.

Las técnicas para aislar e identificar las bacterias fitopatógenas es muy distinta de la utilizada para los hongos, ya que por su tamaño, las bacterias no pueden ser identificadas por medio de observaciones al microscopio, ó a través de montajes temporales.

II. OBJETIVOS

- Practicar dos técnicas para aislar bacterias fitopatógenas de material vegetal infectado, para la obtención de un cultivo puro
- Practicar diferentes tipos de rayados bacterianos, a fin de obtener colonias individuales

III. MATERIALES

Microscopios compuestos, porta – objetos, papel filtro, asa – bacteriológica, algodón, cloro, medios agar nutritivo, King-B, YDC.

IV. METODOLOGÍA

- Concluir con resultados del laboratorio anterior.
- Verter agar agua y hacer transferencia de las siembras de hongos, previa selección, para la obtención de un cultivo puro, con la técnica de cultivo monospórico. (Anexo 3)

¿Cómo confirmar que la muestra a procesar ha sido infectada por una bacteria?

Mediante la observación al microscopio con fondo oscuro. Para esto cortar un pedazo de hoja de aproximadamente 3 x3 mm, de la zona entre tejido sano y tejido necrótico. Preparar un portaobjeto con una gota de agua estéril, colocar en el trozo de hoja y cubrir con un cubre objeto. Usar un campo oscuro en el microscopio, con el objetivo de baja magnificación, observar el exudado bacteriano, proveniente de tejido enfermo (flujo continuo de puntitos blancos)

- Verter medios de A.N, YDC y King-B en platos petri esterilizados (3 platos de cada medio de cultivo)
- Describir los síntomas de las muestras a procesar
- Usar los medios diferenciales para aislar géneros de *Erwinia* y *Ralstonia*
- Practicar realizar un rayado bacteriano/ procedentes de la siembra de dilución
- de suelo
- Practicar los métodos de aislamiento de bacterias fitopatógenas(Anexo 4)
- Realizar diferentes tipo de rayado bacterianos

Técnicas de Laboratorio

- Obtener cultivo puro, mediante la obtención de colonias individuales (próximo laboratorio de acuerdo a resultados obtenidos).
- Hacer subcultivos para obtener un cultivo puro por medio de estriados por dilución. Una colonia pura se obtiene multiplicando una célula que fue separada de las otras por medio del estriado de dilución.

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJES

¿Cómo se realiza una tinción simple y con qué finalidad se utiliza en la identificación de las bacterias fitopatógenas?

Explique cómo realizó el método de dilución en serie en el aislamiento de bacterias fitopatógenas

VI. BIBLIOGRAFÍA

GILCHIRST-SAAVEDRA, L.; FUENTES –DAVILA, G.; MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-ATILANO; DUVEILLER, E.; SINGH, R.B; HENRY, M.; GARCÍA, A, s.f. Guía práctica par la identificación de algunas enfermedades de trigo y Cebada. CYMMYT. Segunda edición

SCHAAD, N.W. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Second Edition. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, página 157

Apuntes

GUÍA 5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS DE SUELO Y MATERIAL VEGETAL

Dra. Isabel Herrera Sirias

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Practicar diferentes técnicas de extracción, de nematodos fitoparásitos de tejido vegetal, raíces y suelo

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCIÓN

La separación y conteo de los nematodos en un volumen de suelo, es la operación indispensable para cualquier estudio de estos microorganismos. Es por ello que esta actividad resulta esencial para poder evaluar el nivel de infestación que presentan las muestras en un momento dado.

Desafortunadamente, hasta el presente no existe ningún método que permita extraer eficientemente todos los tipos de nematodos del suelo y del tejido vegetal.

Para la extracción de nematodos muchas técnicas y modificaciones han sido estudiadas, tomándose en cuenta cuatro factores:

1. Fácil y segura manipulación
2. Extracción eficiente
3. Ahorro de tiempo
4. Suspensión de los nematodos, libres de partículas orgánicas e inorgánicas.

Para la extracción de nematodos de material vegetal y de suelo se utilizan algunas características de los nematodos entre ellos: la forma, el movimiento, el peso específico (1.084 g), geotaxis positiva y coloración diferencial.

Existen alrededor de 10 métodos que pueden utilizarse en la extracción de nematodos. Para fines de estudio, en esta práctica se utilizará el método de tamices más filtro de algodón y centrifugación-flotación para el caso de nematodos de suelo. En el caso de nematodos que se encuentran en el tejido vegetal, se realizará el método de Licuadora más tamices e Incubación utilizando el Humificador.

II. OBJETIVOS

- Aplicar los procedimientos a seguir para la extracción de nematodos de suelo y de material vegetal.
- Analizar los principios en los que se basan los métodos de extracción
- Diferenciar las ventajas y desventajas de los métodos de extracción de nematodos estudiado
- Calcular la población de nematodos en 200 g de suelo
- Analizar la organización y equipamiento del laboratorio de Nematología

III. MATERIALES

Suelo, raíces con nematodos, tamices de extracción, platos de extracción, pichel plástico, tamices: 0.045, 0.100, 0.250 y 0.425 mm de diámetro, licuadora, filtros de algodón, tijeras, papel toalla, beaker, pipeta, piceta, balanza, vasos de vidrio de 100 ml



Figura 2 Instrumentos de trabajo para extracción de nemátodos

IV. METODOLOGÍA

Se conformarán 4 grupos de trabajo, cada grupo aplicará una técnica de extracción y explicará al resto de los grupos de trabajo. Las técnicas, que se aplicarán se describen en (Anexo 5)

- Extracción de nematodos del suelo
- Extracción de nematodos de material vegetal
- Extracción de nematodos con el método centrifugación-flotación
- Extracción de nematodos con método de incubación o humidificador

En el método de centrifugación-flotación, se procederá hacer lecturas en la cuadrículas de conteo de nematos y posterior calcular la población de nematodos en 200 g. de suelo, procesado.

Procedimiento para el conteo de poblaciones de nematodos

1. Se toman 100 cc de la solución con nematodos

Técnicas de Laboratorio

2. Se observará en el microscopio 2 cc para cada cuantificación de esta solución en cuadrículas de conteo de nematodos
3. Con los resultados obtenidos en el paso 2 calcular la población en cc.

Ejemplo Si en 2 cc ---- 1 nematodo
100 cc ---- X

X=50 nematodos /200 g de suelo



Figura 3. Cuadrícula de conteo de nematodos

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJES

- ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de los métodos estudiados?
- ¿Cuáles son los principios en los que se basan estos métodos
- ¿Cuál es el indicativo más importante para saber que el cultivo está siendo afectado por nematodos
- ¿Qué consideraciones haría usted para asegurar que las muestras tomadas sean de calidad, empezando desde la obtención de la muestra hasta la extracción de los nematodos en el laboratorio?
- Considera usted que el etiquetado de las muestras, es poco importante o muy importante? Razone su respuesta.
- ¿Qué características de la biología de los nematodos hace que sea necesario extraer nematodos del suelo y de material vegetal?

VI. BIBLIOGRAFÍA

HERRERA, I; BIJLMAKERS, H. 1993. Manual de Prácticas. Escuela de Sanidad Vegetal. Universidad Nacional Agraria. 44 pág.

S´JACOB, J.J. AND BEZOOIJEN, J. 1984. Manual for practical work in Nematology. Department of Nematology Agricultural University. Waningen, The Netherlands. 77 p.

GUÍA 6. EVALUACIÓN DE SANIDAD DE LA SEMILLA

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Determinar la sanidad de la semilla, mediante la aplicación de técnicas de detección de microorganismos en semilla

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCIÓN

Todos los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, siendo los hongos y las bacterias los más abundantes y la principal causa de enfermedades, ocasionando severas pérdidas económicas al reducir el potencial fisiológico de los granos.

En particular los granos y semillas son invadidos por diversos hongos en el campo, entre ellos *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y muchos otros que causan enfermedades a las plantas y que son transmitidos de un ciclo a otro a través de las semillas. Por otra parte, también los granos y las semillas son invadidos por hongos cuyo hábitat natural no es el campo sino el almacén, siendo principalmente especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Algunas bacterias, pueden conservarse en el interior de la semilla, siendo estas inóculos primarios de infecciones en el campo.

Una característica diferencial de requerimientos de agua para hongos y bacterias de campo y almacén; es que las humedades relativas para estos patógenos en el campo es 90 al 100%, en cambio los patógenos del almacén pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90 %, condiciones muy frecuentes en el almacenamiento de granos.

Las reglas International Seed Testing Association (ISTA) establecen, que normalmente la muestra de trabajo para un análisis de sanidad no deberá ser menos de 400 semillas puras.

II. OBJETIVOS

- Aplicar técnicas de detección y aislamiento de m.o. en semillas
- Demostrar la presencia de m.o. (hongos y bacterias) siembra con el endosperma de la semilla hacia el medio de cultivo
- Cuantificar el porcentaje de semillas infectadas por hongos y bacterias
- Analizar el rol de los diferentes hongos y bacterias encontrados
- Valorar la calidad fitosanitaria de la semilla

- Aislar al patógeno en semilla y obtener cultivo puro

III. MATERIALES

Platos Petri esterilizados, hipoclorito de sodio al 1%, Papel filtro esterilizado, marcadores, semillas de sorgo maíz y frijol, agar agua (AA), agua destilada estéril (ADE), pinzas, vidrio reloj, bisturí papel servilleta,

IV. METODOLOGÍA

Aplicar las siguientes técnicas

- 4.1. En 25 semillas partir la semilla de frijol por la mitad desinfectarla con hipoclorito de sodio 1 % o alcohol histológico 98 % durante 2 minutos, seque las semillas en papel filtro y sembrar 10 mitad de semilla en medio de agar agua (AA), que haga contacto de la parte interna de la semilla con el medio, que queden bien distribuidas en todo el medio
- 4.2. Aplicar la técnica de inducción a la esporulación con el uso de papel filtro, utilizar 50 semillas desinfectadas y 50 semillas sin desinfectar leer metodología descrita en el **anexo 6. En semillas de maz, sorgo y tomate**
- 4.3. Evaluar al segundo día después de la siembra, para anotar crecimiento bacteriano. A los 7 días crecimiento fungoso, según información solicitada en **Tabla 3**
- 4.4. Con ayuda del profesor identificar los géneros de hongos y bacterias incidentes en el análisis de sanidad de semilla. Reconocer el crecimiento bacteriano y fungoso.
- 4.5. Valorar y anotar en (Tabla 3) en sus apuntes sobre la calidad fitosanitaria de la semilla, según resultados obtenidos en el laboratorio
- 4.6. Realizar montajes de hongos y bacterias, según se han realizado en prácticas anteriores, para reconocer los géneros más incidentes
- 4.7 Realiza transferencia de hongo o bacteria, para la obtención de cultivo puro



**Figura 4. Método de detección de microorganismos en semillas
Uso de cámara húmeda (Semillas de sorgo)**

Técnicas de Laboratorio

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJE

¿Cuáles fueron los géneros de hongos más incidentes en el análisis fitosanitario de las semillas de frijol y tomate?

¿Cuál grupo de microorganismo que predominó en las semillas? Se consideran microorganismos de campo o de almacén

V. BIBLIOGRAFÍA

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 1996. International Rules for Seed Testing. Rules 1996. Seed Sci. and Technol. 24 Supplement, Roma. pp 335.

TORRES T. M.; 2002. Control de calidad de semillas. Centro Nacional de investigación Agropecuaria/ CNIA-INTA. Managua, Nicaragua.

Tabla 3. Evaluación de la sanidad de semilla

Semilla / método	Número de semillas afectadas		Porcentaje semillas infectadas	Porcentaje de semillas sanas	Porcentaje de semillas germinadas
	Hongo	Bacteria			

Apuntes

GUÍA 7. TÉCNICAS DE INOCULACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos.

SUBCOMPETENCIA

Demostrar mediante diferentes técnicas de inoculación la patogenicidad de hongos y bacterias, cumpliendo con los postulados de Koch

Tiempo: 8 horas

I. INTRODUCCIÓN

Patogenicidad es la capacidad de ciertos organismos para incitar el desarrollo de una enfermedad infecciosa. Para comprobar la capacidad patogénica de los microorganismos se cumple con cuatro pasos bien definidos llamados postulados de Koch (Robert Koch, 1843-1810). Estos son:

1. El organismo sospechoso de causar la enfermedad debe encontrarse asociado, en forma consistente, a especímenes con la sintomatología de la posible enfermedad
2. El organismo debe aislarse en un medio nutritivo y obtenerse como cultivo puro, para registrar sus características morfológicas, bioquímicas o moleculares
3. El organismo debe inocularse en plantas sanas de la misma especie o variedad donde se observó originalmente el problema y debe producirse los mismos síntomas observados al iniciar el proceso
4. El organismo debe ser reaislado a partir de la planta inoculada en cultivo puro y sus características deben corresponder a las observadas en el segundo postulado

II. OBJETIVOS

- Demostrar la importancia de las heridas en la penetración y establecimiento de las bacterias fitopatógenas
- Practicar dos métodos de inoculación para hongos del suelo en dos momentos definidos (siembra y 7 días después de la siembra (dds)
- Obtener el cultivo puro del patógeno inoculado (bacteria y hongo) e ilustrar los postulados de KOCH

III. MATERIALES

Suelo estéril, maceteras, jeringas, agua destilada estéril, cepas de *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, (24 a 48 edad) *Fusarium* o *Rhizoctonia*, tubos de ensayos etiquetas, asas, aspersor De Vilbiss., cuchillas, bolsas plásticas, semillas de tomate y frijol

IV. METODOLOGÍA

Esta práctica se llevará a efecto a nivel de invernadero, en la cual se establecerá las siembras de los cultivos de frijol y tomate

4.1. Inoculación de bacteria realizando heridas a plantas en hojas con (*Xanthomonas*)

En plantas de frijol inocule los trifolios con *X. campestris* pv. *phaseoli* haciendo cortes con una cuchilla previamente sumergida en la suspensión bacteriana.

Deposite 10 ml de agua destilada estéril en cada una de las cajas Petri con cultivos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Con la ayuda de una asa esterilizada en la llama remueva las células bacterianas y mézclelas con el agua destilada estéril (ADE) de tal manera que el agua se enturbie.

4.2. Inoculación por aspersión en hojas con (*Xanthomonas*)

En plantas de frijol inocular asperjando la suspensión bacteriana con (*Xanthomonas*) sobre el follaje con el aspersor De Vilbiss.

4.3. Inoculación de bacteria realizando heridas a plantas en la axila con (*Pseudomonas*)

4.3.1. Con plantas de frijol y con la ayuda de un gotero/jeringa deposite una gota de la suspensión de *Pseudomonas solanacearum* en la axila de la tercera hoja /hoja bandera. Introduzca la aguja de disección varias veces dentro del tallo a través de la gota de suspensión bacteriana.

4.3.2. Inocular plantas depositando una gota de suspensión de *P. solanacearum* en la axila de la tercera hoja.

Finalmente, inocular en hojas plantas con agua destilada estéril haciendo cortes con la cuchilla y por aspersión. Inocular plantas con agua destilada estéril introduciendo la aguja dentro del tallo y depositando una gota de agua destilada estéril, estas servirán como testigos. Este tipo de inoculación con agua destilada estéril, deberá realizar antes de manipular las cepas bacterianas y estar ubicadas a parte de las plantas inoculadas con los patógenos

Una vez inoculadas las plantas, se deben colocar dentro de la cámara húmeda durante 24 horas. Siete días después de la inoculación se empiezan a observar los primeros síntomas. Observar con cuidado los síntomas desarrollados por cada bacteria y realizar anotaciones.

4.4. Inoculación de hongos causantes de marchitamientos vasculares

4.4.1. En el caso de hongos del suelo como *Fusarium sp/ Rhizoctonia*, colocar discos de 5 cm de diámetro, del micelio del hongo (3 discos) a la orilla de la semilla (tomate) al momento de la siembra.

4.4.2. Hacer una suspensión del crecimiento micelial del hongo con agua estéril remover. Luego escarbar en a la orilla de la siembra de la semilla en un punto y vaciar el contenido de la suspensión. Al momento de la siembra.

4.4.3. Inocular plantas con ADE, escarbar en a la orilla de la siembra de la semilla en un punto y vaciar el contenido de la suspensión. Al momento de la siembra. Plantas testigos

4.4.4. Siete días después de la siembra inocular *Fusarium* en plantas de frijol usando el método de vaciado del patógeno al suelo

Actividades

En grupo de estudiantes organizarse, para realizar la siembra en los siguientes (tratamientos/inoculaciones)

1. Establecimiento de la siembra de frijol y tomate. Cada tratamiento antes descrito estará compuesto por 5 plantas con sus respectivas plantas testigos
2. Realizar inoculaciones de hongos del suelo al momento de la siembra con disco y vaciado de la suspensión del micelio del hongo
3. Siete días después de la siembra realizar la inoculación para los hongos de suelo
4. Dos semanas después de la siembra (dds), realizar las diferentes variantes de inoculaciones con las bacterias de *Xanthomonas* y *Pseudomonas*
5. Regar por la mañana o por la tarde diario las plantas. En los primeros días valora la siembra, la germinación
6. Se aplicará fertilizante de completo al momento de la siembra.
7. A los 8 días después de la siembra (dds), se registraran datos de síntomas observados en plantas inoculadas con patógenos de suelo
8. En caso de presentarse insectos se realizará aplicaciones de insecticidas dentro y en las rondas del invernadero

Técnicas de Laboratorio

9. Treinta días después de la siembra (dds)se finaliza la observación de los datos
10. En los tratamientos donde se presentaron síntomas, proceder a aplicar las técnicas de aislamiento comunes para hongos y bacterias, a fin de confirmar y obtener el mismo patógeno que se aisló. Postulados de KOCH
11. Analiza resultados con el profesor
12. Recoger todo el material utilizado en la práctica y dejar limpio y en orden
13. Entrega un reporte escrito con todos los componentes de un reporte formal (Introducción, objetivo, metodología, resultados y discusión, conclusiones y bibliografía)

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJES

- ¿Cuál fue la mejor técnica de inoculación de bacterias? Explique su respuesta
- ¿Cuál fue la mejor técnica de inoculación de hongos de suelo?
- ¿Cuáles fueron los síntomas en inoculaciones con patógenos de suelo? Cómo verificamos la acción patogénica de estos hongos. Fusarium y Rhizoctonia

VI. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N.; 2002 Fitopatología. Academia Press University of Florida USA
- CASTAÑO-ZAPATA, J. 1986. Prácticas de laboratorio de fitopatología. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
- FRENCH, E. Y HEBER T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA. 154-158 pp

Apuntes

GUÍA 8. TÉCNICA ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE VIRUS FITOPATÓGENOS

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Aplicar técnica serológica-ELISA para determinar presencia de virus fitopatogenos

I. INTRODUCCIÓN

Los virus que atacan a las plantas se diferencian de los demás fitopatógenos por su tamaño y forma, su constitución química (ácido nucleico y proteína) y estructura física, método de infección, propagación, translocación dentro del hospedero, diseminación y sintomatología.

Por su tamaño tan pequeño (medido en nanómetros), los métodos para la detección de virus en plantas se basan principalmente en la transmisión los virus de una planta enferma a una sana por medio de la savia, injertos, plantas parásitas o insectos, hongos y ácaros. Sin embargo la prueba definitiva de la presencia de un virus solo se logra después de su purificación, la visualización de su imagen en microscopio electrónico y/o pruebas serológicas y ácido nucleico.

La técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay) (Figura 1) es un método muy confiable y poco costoso para detectar los virus. Los anticuerpos específicos de las diferentes variantes se pueden comparar y son de fácil utilización. Aunque es ideal tener un espectrofotómetro para la lectura de la densidad óptica del producto de ELISA, la diferenciación de muestras negativas y positivas se puede hacer sin este equipo. La técnica ELISA es rápida y tiene la ventaja de diferenciar entre las variantes del virus sin depender de que haya una buena expresión de los síntomas (Anexo 7)

II. OBJETIVOS

- Demostrar mediante el uso de métodos serológicos la presencia de virus fitopatógenos
- Aplicar la técnica serológica específica para virus fitopatogena cumpliendo con los procedimientos de protocolo descrito
- Preparar soluciones de acuerdo a protocolo descrito y número de muestras a preparar

III. MATERIALES

Plantas enfermas, kit ELISA, reactivos específicos de acuerdo al método a utilizarse

IV. METODOLOGÍA

El procedimiento se realizará en una placa de múltiples pocillos sobre la que se fijan los anticuerpos de interés. Al añadir la muestra que contiene el antígeno complementario se produce una unión que se puede detectar mediante la adición de un segundo anticuerpo contra el mismo antígeno, éste marcado con una enzima que al añadirle un sustrato se hidroliza dando una reacción de color. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra analizada (Figura 3). Organizarse en grupos de 4 estudiantes

Colecta plantas enfermas de tomate con síntomas de virus
Seguir los pasos descritos en protocolo del método ELISA Directo

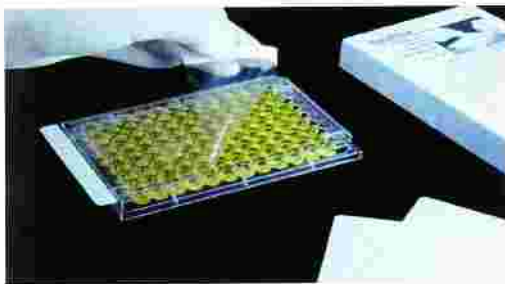


Figura 5. Placa multipocillo "Técnica ELISA"¹



Figura 6. ²"Placa multipocillo ELISA"
Con reacción de color



Figura 7. Principios de "Técnica ELISA"³

Se aplicará las técnicas de ELISA, de Inmuno impresión de impresión de tejidos y Elisa sándwich, cumpliendo con los protocolos para tal fin.

¹ ingebio.cl

² noticias999.com

³ blogs.creamoselfuturo.com

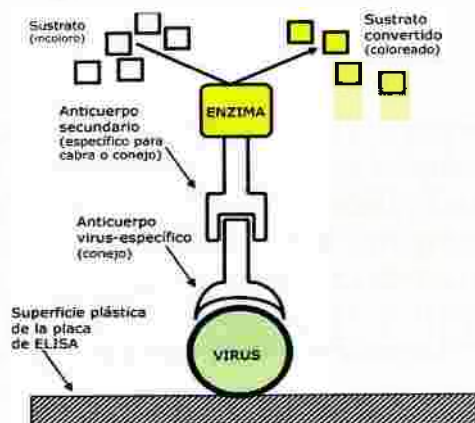


Figura 8. Principios de detección de virus “Esquema Elisa”⁴

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJE

- ¿Cuál es la diferencia entre el método ELISA Directo e Indirecto?
- ¿Cuál es el principio de la Técnica ELISA?

VI. BIBLIOGRAFÍA

ROSALES, M.I.; Diagnóstico de Enfermedades en plantas. Uso de herramientas moleculares. Unidad de Biotecnología INIA-CRI La Platina. Fundación para la innovación agraria (FIA) y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

⁴ apsnet.org

GUÍA 9. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Obtener cultivos puros de hongos entomopatógenos, aplicando técnicas básicas de aislamiento de microorganismos

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos tienen la habilidad de sobrevivir en materia orgánica, suelo, plantas e insectos que atacan. Existen más de 700 especies reunidas aproximadamente en 100 géneros. El género de hongo *Beauveria* ha sido muy estudiado como un controlador biológico de muchas plagas insectiles. El hongo entra a través de la cutícula del insecto, principalmente por las partes frágiles mediante la acción de procesos físicos y químicos producidos durante la germinación y penetración. Otra vía de entrada es a través del tracto digestivo pero, generalmente los conidios no pueden germinar en el intestino.

La multiplicación del hongo en el interior del hospedero conduce a la producción de hifas y toxinas que provoca la enfermedad y muerte del insecto.

Los insectos muertos por *Beauveria* y otro género de hongo entomopatógeno presentan el hongo encima del cuerpo, el cual tiene aspecto algodonoso de color blanco principalmente en las partes más suave del cuerpo del insecto. Estos insectos se pueden coleccionar en campo, para luego reproducirlos y utilizarlos en grandes cantidades.

II. OBJETIVOS

- Aplicar las técnicas básicas para el aislamiento de hongos entomopatógenos
- Obtener un cultivo puro de diferentes hongos entomopatógenos

III. MATERIALES

Platos con PDA, azas, bisturí, alcohol, mechero, papel filtro, insectos coleccionados infectados, tubo de ensayos, papel parafina, pinzas

IV. METODOLOGÍA

La fuente de inóculo de insectos infectados puede ser

1. Insecto infectado naturalmente en el campo
2. Inoculación artificial al insecto en el laboratorio (se coloca el insecto en cámara humedad para hacer esporular el hongo)

4.1. Aislamiento por dilución seriada

Consiste en colocar las fuentes de inóculo (insecto infectado) en un tubo de ensayo que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de tween 80, luego se agita durante 1 minuto. A partir de la dilución (solución madre se preparan diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). La segunda dilución se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril de 1 ml de la solución madre a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril, luego se agita fuertemente y así sucesivamente se repite el proceso hasta lograr obtener las seis diluciones en serie.

En las diluciones se procede a sembrar en plato Petri con medio nutritivo, se recomienda realizar de 3 a 4 repeticiones de siembra por cada dilución tomando 0.1 ml por gota sembrada.

4.2. Aislamiento directo del hongo en el insecto

Este tipo de aislamiento puede ser de 2 formas

Raspando partículas del hongo de un insecto infectado con una asa bacteriológica y tocando en un medio nutritivo

Agarrando con una pinza seca y estéril el insecto esporulando y agitando con movimiento sobre la superficie del medio de cultivo

Actividades

1. Salida al campo (REGEN-UNA). Buscar/Recolectar larvas infectadas. En cultivos agrícolas (Esta tarea realizarla por la mañana.). Trabajar en grupo (preferiblemente un día antes y colocar en cámara húmeda en un plato Petri)
2. Visitar al laboratorio de hongos entomopatógenos (charla corta/interactiva y recorrido de las instalaciones)
3. Practicar métodos de aislamiento de hongos entomopatógenos
4. Obtener un cultivo puro

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJES

¿Cuál es la técnica de aislamiento más eficiente y por qué?

¿Cuáles son las diferencias en la estructura y organización del laboratorio de hongos entomopatógenos?

VI. BIBLIOGRAFÍA

MONZÓN, A.; ZAMORA, M. 2004. Producción y uso de *Beauveria bassiana* para el control de plagas. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Departamento de Protección Agrícola y Forestal

Apuntes

GUÍA 10. CALIBRACIÓN DE MICROSCOPIO

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Determinar el valor micrometrado a fin de medir la longitud de las esporas y relacionar con las características morfológicas de la especie en estudio

Tiempo: 4 horas

I. INTRODUCCIÓN

La unidad de medida en microscopia es de 0.001 mm (= 1 micra) y se conoce con el nombre de micra (μ).

Cuando examinamos un hongo, una célula bacteriana, un nematodo fitoparásito, un insecto etc., para determinar a qué especie pertenece es de importancia determinar el tamaño de sus estructuras: esporas, cuerpos fructíferos, conidióforos, longitud y ancho de la estructura en estudio etc. Para ellos nos servimos de un **micrométrico ocular**, que consiste una lámina redonda transparente que se coloca en el ocular del microscopio, con una escala graduada, para realizar las mediciones.

Debido a que los aumentos varían de un microscopio a otro, las escalas de los micrómetros oculares no representan medidas convencionales, sino simples unidades. Para determinar la distancia lineal que representa cada unidad o sea el valor micrométrico, deben efectuarse calibraciones para cada aumento de un microscopio. Se emplea para tal fin un **micrómetro objetivo** o micrométrico de platina que es similar a un porta objeto y tiene grabada una escala que representa medidas exactas y convencionales.

Generalmente se emplea un micrómetro objetivo cuya escala comprende de 100 ó 200 divisiones de 0.01 mm.

II. OBJETIVOS

- Calibrar el microscopio a fin de realizar mediciones en el microscopio
- Medir dos especies diferentes de hongos
- Indagar acerca de la medición de la especie en estudio

III. MATERIALES

Microscopio, micrómetro objetivo, micrómetro ocular, porta objeto, cubre objeto, asas, cultivo de hongo, papel toalla, pizetas, lactofenol azul, servilletas para limpieza de lentes

IV. METODOLOGÍA

Para obtener el valor micrométrico del microscopio, examinamos el micrómetro objetivo, el cual colocamos en la platina del microscopio, luego utilizando el micrómetro ocular procedemos a determinar el valor numérico. Es necesario usar primero el objetivo de bajo poder para ambas escalas sean visibles. El micrómetro ocular se gira hasta que las líneas de la escala sobre el disco aparecen y quedan paralelas a las líneas o divisiones del micrómetro objetivo. Luego observamos cuántas divisiones del micrómetro objetivo son cubiertas por una o varias del micrómetro ocular. Establecido este dato, se determina la fórmula o valor micrométrico.

Por ejemplo, si la división 10 del ocular, cubre cuatro unidades del objetivo, una unidad o división del ocular representará: $4 \times 0.01 \text{ mm} / 10 = 0.004 \text{ mm} = 4 \text{ micras}$. Cada división 10 del micrómetro ocular vale por tanto 4 micras para la combinación óptica con que se trabaja. Por consiguiente, el valor micrométrico (VM) en micras se obtiene así:

$$\text{Valor micrométrico} = \frac{\text{División del micrómetro objetivo en micras} \times 1000}{\text{División del micrométrico ocular}}$$

Se debe calcular el valor micrométrico para el objetivo que se va a utilizar. Una vez hallado este valor, se retira micrométrico de la platina, y en su lugar se coloca la preparación en la cual queremos verificar las mediciones.

Para usar el micrométrico ocular, enfocararlo sobre un objeto a ser medido (esporas de hongos) mover el porta objeto hasta que el espécimen se alinee exactamente con el extremo de la escala del ocular. Contar cuantas unidades está ocupando el espécimen y multiplicarlo por el valor ya calculado.

Por ejemplo si el espécimen ocupa 6 unidades con el valor numérico hallado en el ejemplo anterior tendremos: $6 \times 4 = 24 \text{ micras}$. Este valor será la dimensión del objeto.

Al trabajar con un objetivo de mayor aumento y medimos el mismo espécimen de nuevo. Encontramos que éste será más grande. Esto no puede ser verdad. Obviamente la escala para cada lente de objetivo es diferente. Debemos repetir e

Técnicas de Laboratorio

procedimiento de calibración o sea obtener el valor micrométrico para cada objetivo del microscopio

Actividades

Calibración del microscopio

Hallar el valor micrométrico

Realizar mediciones de 50 esporas diferentes. Sacar promedio y encontrar el tamaño de longitud de la espora a medir.

Consultar bibliografía de la medición del género de hongo en estudio



Figura 9. a. "Micrometro ocular
b.Micrometro objetivo"⁵

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJE

- ¿Por qué es necesario encontrar el valor micrométrico, para objetivo del microscopio?
- ¿Por qué es importante medir la longitud y ancho de una estructura de un patógeno o insecto?
- Coincide la medición de la especie en estudio, con la reportada en la literatura, explique su respuesta

VI. BIBLIOGRAFÍA

CASTAÑO, J. Z. 1986. Prácticas de laboratorio de fitopatología. Departamento De Protección Vegetal. Proyecto AID/Honduras. Publicación MIPH-EAP

Apuntes

⁵ prismacontrol.es

GUÍA 11. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ESPORAS O PROPÁGULOS MEDIANTE EL HEMACITÓMETRO

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Cuantificar la cantidad de esporas por ml, cumpliendo con el protocolo descrito y normas de uso y manejo del Hemacitómetro

Tiempo: 4 horas

I.INTRODUCCIÓN

Para realizar pruebas de inoculación cuantificadas es necesario conocer el número de unidades de infección en el inóculo. Una técnica es contar el número de esporas en el Hemacitómetro.

El Hemacitómetro es una pieza de vidrio en forma de H con dos cámaras de conteo. El fondo de cada una de las cámaras tiene un rayado de 9 mm dividido en 9 cuadrados principales de 1 mm por cada lado. El mm^2 del centro está dividido en 25 grupos de 16 cuadrados pequeños cada grupo está separado por líneas triples. Las superficie reticular se encuentra a 0.1m debajo del cubreobjetos, por lo tanto, el volumen del líquido sobre 1 mm^2 es 0.1 mm^3 .

El cubre objeto es grueso para impedir que se hunda el centro en su parte no sostenida, lo cual reduciría el volumen de las cámaras. Para su uso se coloca el cubre objeto limpio sobre la cámara de conteo de tal manera que llegue a estar en contacto con los altorrelieves de la cámara. Con la ayuda de una pipeta deposite una gota de la suspensión de esporas en el margen del cubre objeto y el área reticular del portaobjetos. Permitir que se asienten las esporas durante 1 0 2 minutos y observe la distribución de las esporas. Estas deben estar de manera uniforme distribuidas en todos los cuadrados de la cámara.

Las esporas pequeñas se cuentan en el mm^2 central, el cual está compuesto de 25 grupos de 16 cuadrados pequeños. Cada uno de estos grupos mide 0.04 mm^2 . Contar el número de esporas en los 4 grupos de las esquinas central. Sumar el total de esporas en los 5 grupos y calcular el número de esporas /ml de la siguiente manera

$$0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.004 \text{ mm}^3$$

$$X = E/5 \times 1/0.004$$

X = X 50 en donde, X = Número de esporas /ml

E = Esporas en los 5 cuadrados de 0.04 mm^2

$$1 \text{ ml (cc)} = 1000 \text{ mm}^3$$

$$X = E \times 50 \times 100$$

X = E X 50 000 em donde, X = Número de esporas /ml

E = Esporas en los 5 cuadrados de 0.04 mm^2

Las esporas grandes se cuentan en 5 cuadrados principales de 1 mm de lado; Los cuatro de las esquinas y el central. La constante a multiplicar es 2000.

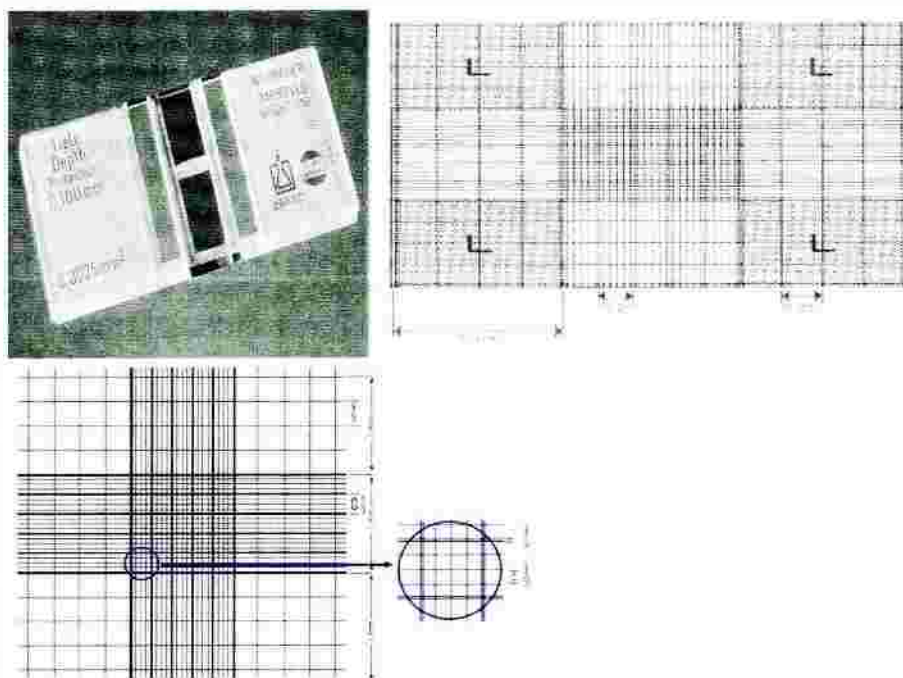


Figura 10. Contador de esporas "Hemacitómetro de Neubauer"⁶

II.OBJETIVOS

- Usar el hemacitómetro, para cuantificar la concentración de esporas grandes y pequeñas en ml
- Aplicar las reglas de conteo de esporas, según protocolo descrito
- Determinar concentración de esporas ml
- Calcular concentraciones de esporas

⁶ html.rincondelva.go.com

III. MATERIALES

Cultivo pura con esporas de *Fusarium*, pizeta, tubo de ensayo, gradillas, pipetas Pasteur, pañuelos para lentes de microscopio, papel toalla, lactefenol 25 %, porta objeto, cubre objeto, agua destilada estéril

IV. METODOLOGÍA

1. Preparar en agua una suspensión de los propágulos a contar, de mayor concentración que la deseada. Si los propágulos tienden a permanecer unidos o aglomerados agregar un detergente Tween 80 a razón de 250 ppm; mezclar y agitar. El volumen total original en ml entra en el cálculo final
2. Tomar una alícuota pequeña y agregue un tinte vital algodón azul o lactofenol para facilitar la observación de células poco refractivas.
3. Limpiar las superficies de la cámara entre cada observación; enjuague con agua de una pipeta y seque por contacto con papel o tela absorbente y por último con papel de lente
4. Colocar el cubre objeto especial sobre los rieles paralelos a ambos lados de la cámara, frotando ligeramente para conseguir buen contacto
5. Con una pipeta delgada que no gotee tomar una muestra de la suspensión y aplicar a la ranura al centro del margen de una de las cámaras donde será rápidamente absorbida por fuerza capilar. Quitar exceso que rebose en los bordes
6. Vacíe la pipeta y repita el proceso anterior para la cámara opuesta; monte al microscopio y ubique el rayado de una de las cámaras con el objetivo de menor aumento, girando luego al revolver para mayores aumentos.
7. Según sea los propágulos grandes o pequeños, realice contadas respectivamente en cinco cuadros principales (CP) y multiplíquela suma de estos por 2000, para obtener el número por ml. Lo propágulos que estén sobre las líneas de los márgenes de los cuadrados deben contarse sólo en dos de éstos, los de los lados izquierdo y superior
8. Repetir las contadas obre el segundo rayado en la otra cámara. El conteje total debe exceder 200 para que el error de variabilidad no exceda el 15 %. Si es inferior se deben realizar más observaciones o preparar una mayor concentración. Promediar las observaciones para determinar la concentración de las suspensión de los propágulos (propágulos /ml) preparada
9. calcular el volumen final necesario para llevar la suspensión de propágulos a la concentración deseada :

Técnicas de Laboratorio

Propágalos/ml/propágulos/ml deseado X volumen total original (ml)= Volumen final (ml)

Una vez obtenida la concentración correspondiente a la suspensión inicial. Calcular una dilución determinada. Se aplica la siguiente fórmula

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Dónde

C_1 = Concentración inicial (conocida en el conteo)

V_1 = Volumen inicial (establecido arbitrariamente al preparar el Inóculo)

C_2 = Concentración final deseada (según el estudio a realizar)

V_2 = Volumen final (desconocido)

Despejando

$$V_2 = \frac{C_1V_1}{C_2}$$

C_2

Si el volumen inicial era de 100 ml y se desea una concentración de 30 000 conidio /ml, entonces

$$V_2 = \frac{\text{Concentración calculada} \times 100 \text{ ml}}{30\ 000} = \text{Volumen final (ml)}$$

Con los datos obtengan

Calcular la concentración del inóculo inicial

Calcular la cantidad de líquido que se debe agregar a la suspensión de esporas preparada, para obtener una concentración de 30 000 esporas por ml.

Actividades

Organizarse en grupos de dos estudiantes

Prepara la suspensión de esporas

Identifica los componentes del Hemacitómetro

Realizar conteos

Calcular concentraciones de esporas

V.PREGUNTAS DE APRENDIZAJE

¿Por qué es necesario conocer la concentración de esporas, para trabajos de inoculación o formulaciones de productos biológicos?

VI.BIBLIOGRAFÍA

FRENCH, E. Y HEBER T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA.

GILCHIRST-SAAVEDRA, L.; FUENTES -DAVILA, G.; MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-ATILANO; DUVEILLER, E.; SINGH, R.B; HENRY, M.; GARCÍA, A, s.f. Guía práctica par la Identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CYMMYT. Segunda edición

GUÍA 12. ORGANIZACIÓN Y PRINCIPIOS DE TRABAJO DE LABORATORIO CON TÉCNICAS MOLECULARES

COMPETENCIA

Aplicar técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades en plantas, cumpliendo con las medidas de asepsia, procedimientos de protocolos y cultivo puro de agentes fitopatógenos

SUBCOMPETENCIA

Aplicar algunos principios de trabajo y organización en el uso técnicas moleculares, para la detección de fitopatógenos

Tiempo: 4 horas

I.INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de fitopatógenos por medio de la identificación de sus ácidos nucleicos es un concepto que se ha desarrollado en las últimas décadas, cada vez nuevas técnicas son actualizadas y reportadas en revistas científicas como las técnicas eficientes y acertadas en el diagnóstico de enfermedades.

Las pruebas para diagnóstico convencional de patógenos de plantas se basan en características morfológicas y morfométricas; las cuales requieren de aislamiento y crecimiento en cultivos puros para la identificación y experiencia taxonómica y entrenamiento para identificar a nivel de especies.

Los avances en biología molecular han brindado nuevas vías para la detección e identificación de patógenos de plantas. No obstante estas técnicas no excluye la importancia de la aplicación de las técnicas convencionales.

La reacción en cadena de la polimerasa puede ser utilizada para detectar diminutas cantidades de ADN de un fitopatógeno que esté presente en suelo, tejido, savia, etc. Esta técnica permite multiplicar geométricamente regiones específicas del ADN blanco por medio de ciclos sucesivos de síntesis que ocurren "in vitro". Los componentes de reacción de PCR son el ADN en blanco, nucleótidos, una enzima llamada ADN, polimerasa y partidores (iniciadores o cebadores, primers). Los partidores son pequeñas cadenas de nucleótidos que definen la secuencia de ADN que será amplificada. Proceso ilustrado en Figura 11. La PCR ha sido aplicada inicialmente en la detección e identificación de fitoplasmas, virus, viroides, bacterias fastidiosas. Pero también en hongos, bacterias y nematodos. En la identificación a nivel de especies, en las que las diferencias entre ellas son mínimas y difíciles de caracterizar morfológicamente. En general la aplicación de esta técnica al diagnóstico de enfermedades en plantas se ha centrado en organismos que no son fácilmente detectados por

medio de otros métodos o en aquellos casos en que la obtención de resultados es lenta.

Entre las ventajas que presenta esa técnica se destacan su sensibilidad (100 a 1 000 más sensible que ELISA), la rapidez en la obtención de resultados y el potencial para detectar varios patógenos simultáneamente. Las desventajas que presenta son el alto costo de sus reactivos y equipos y de un entrenamiento adecuado para su ejecución debido a la posibilidad de contaminación y la consecuente obtención de falsos positivos.

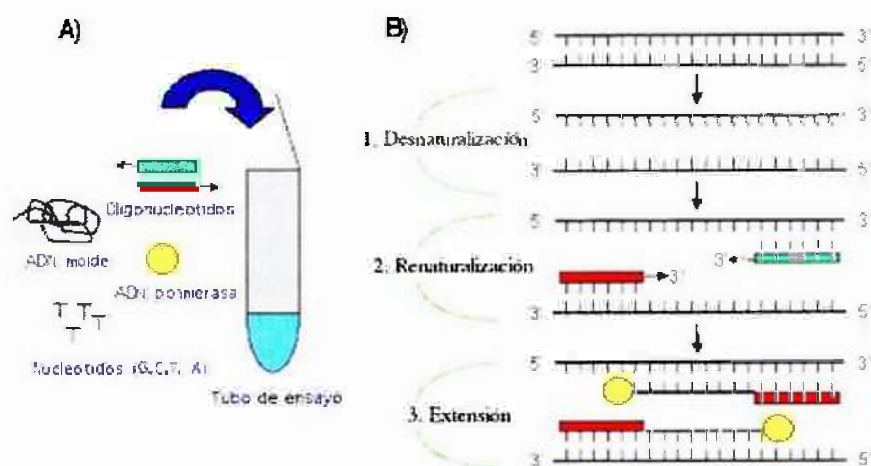


Figura 11 “Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)”⁷

Para lograr la duplicación de un tramo de ADN, cada ciclo de la técnica PCR incluye tres etapas: 1) Desnaturalización, durante la cual se separan las dos hebras constituyentes del ADN; 2) apareamiento de los "iniciadores" o primers del tramo a replicar; 3) extensión de las cadenas de primers gracias a la acción de una enzima ADN polimerasa. La repetición de los ciclos permite multiplicar geoméricamente los tramos de ADN elegidos.

II. OBJETIVOS

Diferenciar la organización de trabajo de laboratorio de diagnóstico de enfermedades en plantas con técnicas moleculares

Usar y manejar de forma adecuada de micropipetas

Preparar Gel de Agarosa

Calcular volúmenes de algunas soluciones

Demostrar la extracción de ADN, en plantas infectadas con virus u hongo

Fitopatogenas

Valorar la calidad del ADN

⁷ psiquiatria.com

III. MATERIALES

Micropipetas, gel de agarosa, plantas infectadas, protocolo de extracción de ADN

IV. METODOLOGÍA

Esta práctica se realizará en el laboratorio de Biología Molecular de la UNA. Antes de la sesión práctica, indagar a través de sitios web información referente a los siguientes tópicos

PCR

<http://www.youtube.com/watch?v=Kuy4PDb6bdU&NR=1>

<http://www.youtube.com/watch?v=i1o4jYepdxs>

Electroforesis en gel. No vamos a hacerlo exactamente, pero entender el principio.

<http://www.youtube.com/watch?v=sbCusDyYoi0&NR=1>

Extracción de ADN. Aunque habrán diferencias entre este método y el aplicarse, ustedes pueden comenzar a aprender a aprender y pensar el principio.

<http://www.youtube.com/watch?v=7jnHtKYI0ng>

- Discusión y análisis previo de la indagación e información previa a la práctica con el facilitador
- Reflexión y análisis de la organización del laboratorio de Biología Molecular
- Anotar los principales equipos de trabajo
- Usar las micropipetas
- Calcular volúmenes y preparar algunas soluciones
- Preparar un gel de agarosa
- Extracción de ADN, según protocolo de la muestra a procesar

V. PREGUNTAS DE APRENDIZAJES

- Haga un listado de los principales equipos utilizados en las técnicas moleculares
- ¿Qué es la Biología Molecular?
- Cuáles son las secciones o cuartos de trabajo con técnicas moleculares
- Cómo funciona un termociclador PCR-convencional
- Para qué se prepara el gel de agarosa y por qué se usa solución buffer

VI. BIBLIOGRAFÍA

ROSALES, M.I.; Diagnóstico de Enfermedades en plantas. Uso de herramientas moleculares. Unidad de Biotecnología INIA-CRI La Platina. Fundación para la innovación agraria (FIA) y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

GÓMEZ-ALPIZAR, L.; FLORES, L.; BRENES, A.; PÉREZ, G.; DURAN, L 2010 Diagnóstico Molecular de Patógenos de Plantas. Centro de Investigaciones Agronómicas. San José, Costa Rica

ANEXOS

Anexo 1. Trabajo aséptico de laboratorio

1.1. Métodos y técnicas para la esterilización y desinfección

La **esterilización** la definimos como la eliminación por muerte o separación de todo organismo viviente de un material. También puede significar el hacer infecundo a un organismo. **Desinfectar**, es la eliminación o neutralización de microorganismos para evitar una infección o avance de los mismos.

Métodos físicos

1. Térmico

- Calor seco, consiste en calentamiento del material en ausencia de agua. Exige temperaturas mayores que la calefacción húmeda. Se utilizan materiales resistentes al calor como por ejemplo la cristalería en hornos.
- Calor húmedo, calentamiento con presencia de agua. En la calefacción húmeda se pueden utilizar los métodos: ebullición, la pasteurización, tindalización y la autoclave. El método de autoclave es el más usado y confiable para esterilizar medios de cultivos. El autoclave es idéntico a una olla de presión.

Tanto en la calefacción seca como en la húmeda existe una relación directa entre la temperatura y tiempo de exposición. Mayor temperatura, menor tiempo de exposición. El tiempo de exposición se calcula desde el momento que el material a esterilizar alcanzó la temperatura correspondiente. (Tabla. 1).

Tabla 1. Tiempos y temperatura de esterilización

Temperatura	Tiempo de esterilización calor húmedo	Tiempo de esterilización calor seco
100° C	2 h	
110° C	2.5 h	
115° C	51 min	
121° C	15 min	12h
140° C	---	3h

Flamear y quemar

La aguja de transferencia y asa son hechas de cromoníquel, entonces pueden ser **quemadas** en la llama de un mechero al rojo vivo. Después se moja en alcohol

Técnicas de Laboratorio

etílico al 96% (para su enfriamiento), se enciende el alcohol en la llama y se deja quemar.

Materiales de acero, como por ejemplo soporte de aguja de transferencia, pinzas, bisturí, pinchos, tijeras no pueden ser quemados al rojo vivo sino **flameado** (mojar con alcohol etílico 96%, encender, y dejar quemar). Materiales inflamables como por ejemplo papel filtro y madera, se flamean ligeramente pasándolos algunas veces por la llama de un mechero.

Métodos químicos:

- Uso de gases y vapores (óxido de propileno C_3H_6O , vapor de formaldehído HCHO).
- Uso de líquidos y soluciones químicas. En general son usados como desinfectantes. Tienen como desventaja que permanecen en el medio esterilizado por no ser volátiles. Sin embargo, para la **desinfección** de superficie tienen amplia aplicación. Las superficies a desinfectar pueden ser por ejemplo mesa de trabajo, utensilios de laboratorio, material vegetal.

Entre los desinfectantes se pueden mencionar:

- ✓ **Alcoholes:** Sobre todo el alcohol etílico. (70% ó 95%).
- ✓ **Cloro:** Es liberado como gas en agua de compuestos de hipoclorito de sodio, potasio o calcio. Para la desinfección de material vegetal es ideal hipoclorito de sodio al 1 ó 2%
- ✓ **Formalina:** Al 4% se usa para la desinfección de mesas de trabajo, cuartos de transferencia, semillas, partes vegetales leñosas. Es muy corrosivo y acción lenta.
- ✓ **Agua oxigenada H_2O_2 :** Se usa para la desinfección de semillas. Por ejemplo 30 minutos H_2O_2 al 30%.

1.2. El trabajo aséptico en la sala de prácticas

Para los laboratorios, los alumnos no disponemos de cuartos estériles con suficiente capacidad para todos, entonces tenemos que tomar en cuenta ciertas reglas para que podamos trabajar bien en la sala de prácticas de Fitopatología.

1. Cumplir siempre en la limpieza: lavarse las manos, limpiar las mesas, no dejar objetos innecesarios en la mesa, desinfectar las mesas, tener cuidado con material fungoso que está esporulando, eliminar directamente cualquier basura de las mesas.
2. Evitar corrientes de aire innecesarios. No hacer movimientos innecesarios durante trabajos asépticos, no caminar innecesariamente, cerrar las ventanas y apagar los aires acondicionados.

Técnicas de Laboratorio

3. El trabajo estéril se hace rápido, por corto tiempo podrán estar abiertos los platos estériles, para verter medios o siembras o verter en matraces, etc. Entre mas corto el período en que están expuestos la cristalería estéril menos probabilidad de contaminarse.
4. Un objeto estéril una vez en contacto con un objeto no estéril (por ejemplo: una mesa) ya no es estéril. Por ejemplo el tapón de algodón, aguja de transferencia, pipeta, etc. tiene que ser esterilizados de nuevo.

Anexo 2. Recetas de medios de cultivos

Los medios nutritivos se clasifican según el origen, consistencia y uso

Origen { Medios naturales: (leche, frutas, suero de la sangre).
Artificiales: (Recetas de cocciones o infusiones de origen
Sintéticos: (Sustancias puramente químico, sales, carbohidratos y vitaminas

Los medios naturales se usan: Material vivo del hospedero (planta), para los parásitos obligados, que no pueden ser cultivados sobre medios artificiales, sino solamente sobre material vivo del hospedero. Sobre hojas cortadas, pedazos de frutas (papá, zanahoria) esterilizados, madera, tallo, semillas.

Consistencia { Medios líquidos: Consiste en el agua y sustancias solubles ej. Caldos se usa en el estudio de propiedades fisiológicas químicas de los microOrganismos
Semi sólidos: Baja concentración de solidificante (0.5% - 5% agar gelatina), se utiliza para mejorar la motilidad del cultivo investigado
Medios sólidos: Se le añade solidificante de agar – agar de 10, 15, 20% y se utiliza para el aislamiento de cultivos puros de microorganismos y estudio de características morfológicas.

Uso

Generales: Papa dextrosa agar, agar nutritivo (PDA, AN), para crecimiento de hongos y bacterias
Específicos: Para ciertos grupos de m.o. (m.o descomponen células).
Selectivos: Desarrollo de una sola especie o grupo de m.o. para estudiar algunas propiedades, diferenciales m.o.
Medios de diagnósticos o diferenciales: Se usan en estudios bioquímicos, aislamiento de cultivos puros e identificación.

2.1. Determinación del pH

El pH del medio también tiene efecto sobre la selectividad del medio, como también en el desarrollo de los m.o. En general los hongos prefieren un pH más bajo (pH= 5.5 a 6.5) que las bacterias (pH= 7).

Para el aislamiento de hongos de material vegetal se usa en general medios de cultivo acidificado. Una o dos gotas de ácido láctico al 25% añadido a 10 ml de agar derretido antes de verter el plato ó 100 gotas de ácido láctico a 1000 ml de PDA, una vez esterilizado antes de verter. El uso de antibiótico, para inhibir crecimiento bacteriano.

El pH representa o indica neutralidad H^+

El pH arriba de 7.0 indica que la solución es más alcalina (tiene menor cantidad de hidrogeniones que el agua).

El pH debajo de 7.0 indica que la solución es más ácida que el agua.

El pH del agua destilada es ideal, para medios de cultivos 5.5-6.5

¿Cómo determinar el pH?

- Papel o cinta para medir el pH (papel pH).
- Potenciómetro que mide la diferencia de potencial de Hidrogeniones H^+ entre la solución examinada y una solución estandarizada (voltios).
- Calorímetro – se utilizan distintos indicadores en solución en las que el color de la solución corresponde a un pH definido.
- Para realizar ajustes de pH a medios de cultivos, se utilizan soluciones NaOH 1 N y HCl 1N; se mide primero el pH del medio antes de esterilizarlo y luego se ajusta agregando gota a gota. Se usa ácido clorhídrico, para bajar el pH (acidificar) y NaOH, para alcalinizar

Técnicas de Laboratorio

2.2. ¿Qué sustancia se usa como solidificante?

- a. Agar – agar, polisacárido complejo que se obtiene de algas marinas a garofitas (Algas rojas) 70 – 80% de polisacárido, agua y sustancias minerales.
- b. Gelatina, naturaleza proteica, se obtiene de los huesos, puede descomponerse por enzimas proteolíticas y por eso no se utiliza ampliamente con solidificante

2.3. ¿Cuáles son las exigencias de un Medio de Cultivo?

Poseer sustancias nutritivas necesarias (fuente de nitrógeno, carbono, oxígeno, hidrógeno, sales inorgánicas, factores de crecimiento).

Estar húmedo, para que los m.o. puedan asimilar sustancias nutritivas solubles, estériles, transparente, pH determinado.

2.4. ¿Cómo verter medio en platos petri?

Generalmente se vierte entre 10 y 15 ml por plato Petri (tamaño normal). Primero se derrite el medio al baño maría y después se deja enfriar hasta 45 - 50° C. cuando se vierte un medio muy caliente se condensa demasiada agua en la tapa del plato lo que puede causar problemas a la hora de observar el plato bajo el microscopio estereoscópico.

Una condensación ligera se puede eliminarse con algodón. Después se desinfecta la tapa con algodón remojada en alcohol y se flamea. Lo más adecuado es verter el medio cuando los platos estériles están ubicados en la orilla de una mesa desinfectada. Así le queda suficiente espacio para maniobrar con el matraz y al verter, la abertura entre la tapa y el plato se mantiene bastante reducida. Antes de verter el medio se elimina la tapa del matraz con el dedo auricular y anular de la mano izquierda cerca de la llama del mechero.

Ahora se flamea el cuello del matraz procurando que éste no se caliente demasiado. Luego se desplaza al matraz en la dirección lateral hacia los platos (nunca efectuar movimientos verticales con el matraz). Los platos se abren levantando un poco la tapa inclinándola para atrás. Hay que verificar si el medio se distribuyó por todo el fondo del plato (si no es así, con la mano izquierda se mueve o inclina un poco el plato). Si sobra un poco de medio de cultivo en el matraz, se vuelve a tapar pasando el tapón y cuello del matraz por la llama.

2.5. Recetas para algunos medios de cultivos más comunes

2.5.1. Agar agua

Útil cuando se desea un crecimiento espaciado del micelio.

Agua 1000 cc; Agar 10-20 g

Preparación: agréguele el agar al agua, caliéntelo hasta derretirlo. Distribúyalo y esterilícelo.

2.5.2. Papa - Dextrosa - Agar (PDA)

Útil para el crecimiento de la mayoría de los hongos cultivables y para el aislamiento de éstos cuando no hay problema de contaminación bacteriana.

Trozos de papa pelada: 250 g

Azúcar (sacarosa, dextrosa, glucosa): 10 g

Agua: 1000 cc

Agar: 18 g

Acido láctico: 25% 100 gotas (Para eliminar bacterias)

Preparar el PDA, instantáneo, según prospecto

Preparación: Pele y parta la papa en trozos, hiérvala en 500 cc de agua destilada por 30 minutos mientras derrite el agar en otros 500 cc. Filtre el caldo de papa con un tamiz y gasa. Junte las dos preparaciones, agréguele y disuelva el azúcar, y sustituya al agua hasta completar los 1000 cc y esterilizarlo.

2.5.3. Agar nutritivo

Es apropiado para el aislamiento de la mayoría de las bacterias patogénicas de plantas. Las bacterias generalmente prefieren un medio neutro o ligeramente alcalino.

Extracto de carne: 3.0 g

Peptona: 5.0 g

Glucosa: 2.5 g

Agar: 15.0 g

Agua: 1000 ml

Medios instantáneos: Son los medios que se pueden adquirir en el comercio en forma deshidratada (polvo, grano o pastillas). Las marcas más conocidas son DIFCO (EEUU) y Oxoid (Inglaterra). En general, solamente falta añadir la cantidad de agua dictada y esterilizarlo.

2.5.4. Medio Kin B para *Pseudomonas*

H ₂ O dest	- 1000 ml
Proteosa peptona	- 20 g.
Glicerina	- 10 ml
K ₂ H PO ₄	- 1.5 g.
Mg SO ₄ 7H ₂ O	- 1.5 g.
Agar	- 15 g.
Ph	7.4

2.5.5. YDC (Erwinia)

Parte I

Ca Co ₃	- 20 g.
Extracto de levadura	- 10 g.
Agar	- 15 g.
Agua destilada	- 900 ml

Parte II

Dextrosa	- 20 g.
Agua destilada	- 100 ml

Pseudomonas -
AgarF
(basis)

Anexo 3. Técnicas de aislamientos de Oomycetes y hongos fitopatógenos

3.1. Inducción de la esporulación y/o fructificación

Para aislar hongos de crecimiento lento (hojas, tallos) *Cercospora*, *Septoria*, *Phoma* y otros. La mayoría de los hongos que atacan las partes aéreas de las plantas esporulan abundantemente si el tejido del hospedador (planta), se mantiene en alta humedad relativa. La esporulación ocurre en la mayoría de los hongos en 2 – 3 días y la formación de cuerpos fructíferos entre 1 a 2 semanas

Esta técnica es conveniente, para manchas foliares producidas por hongos que forman cuerpos fructíferos en la cual se procede primeramente a poner en cámara húmeda y a las 24 o 48 horas, con la ayuda de un microscopio estereoscópico se toman las esporas o cuerpos fructíferos mediante una aguja fina, y se depositan haciendo un estriado sobre la superficie de agar, o bien se añaden una o dos

Técnicas de Laboratorio

gotas de agua estéril en la superficie del agar (preferible acidificado) de modo que el estriado se hace a partir de las gotas. Otra forma es tomar con una aguja los cuerpos fructíferos cerrados conteniendo esporas, se pueden transferir a un portaobjeto (estéril) o (flameado) en 3 o 4 gotas de agua estéril se presionan y las esporas que salen se colectan con una aguja y se depositan sobre agar.

3.2. Inducción al desarrollo vegetativo/miceliar

Para aislar hongos causantes de marchitez/ pudriciones radiculares y mal del talluelo.

Se lava el tejido infectado en agua, para separarlo de la materia orgánica extraña. El siguiente paso es la desinfección superficial del tejido, mediante diversos compuestos/ químicos, de los cuales el más usado es el hipoclorito de sodio al 1%, alcohol histológico al 95 %. Si el patógeno por aislar se encuentra solamente en los tejidos celulares externos del hospedante, se debe eliminar este paso. La selección de la porción de tejido enfermo, de la cual se va a hacer el aislamiento, es también muy importante para la obtención del patógeno primario libre de contaminación. Es mejor aislar del margen del tejido infectado, especialmente en el caso de tejidos jóvenes que son fácilmente invadidos por microorganismos secundarios. En caso de que se trate de organismos que invaden determinados tejidos, pueden eliminarse éstos, asépticamente, dejando sólo el tejido infectado. Cuando se desea aislar hongos se puede evitar la contaminación bacteriana añadiendo al medio del cultivo (PDA), antibiótico como estreptomycinina en concentraciones de 100 – 500 p.m.

Si no se desea usar antibióticos, se puede acidificar el PDA con unas gotas de ácido láctico para bajar el ph a 4.0 o 5.0. Este ph usualmente inhibe el desarrollo de las bacterias pero no el de la mayoría de los hongos. En el PDA acidificado se utiliza 100 gotas de ácido láctico en 1000ml de PDA.

3.3. Aislamiento mediante trampas o cebos

Para aislar hongos del suelo y aire

Los estudios de poblaciones en el aire, suelo y agua proporcionan información acerca de cómo los hongos patógenos sobreviven cuando el hospedero no está presente, como se mueven de un lugar a otro y cómo se reproducen en la ausencia de estos. El aislamiento de los hongos presentes en el aire se lleva a cabo mediante el uso de portaobjetos cubiertos con sustancias pegajosas tales como vaselina. Las esporas se pueden atrapar a diferentes alturas, sobre los campos afectados.

El aislamiento de hongos en el agua, por ejemplo de canales de irrigación, generalmente requiere el uso de cebos. Las especies de *Phytophthora* que ocasionan las pudriciones radicales de diversos cultivos, pueden atraparse

Técnicas de Laboratorio

poniendo frutos intactos de manzana, pera o limones, para la especie *P. citrophthora*, en el agua de riego. Estos hongos atacan la superficie del fruto y ocasionan una mancha café en el tejido inmediato interior, de donde el hongo puede ser aislado usando medios selectivos.

Mediante esta técnica se ha demostrado que *P. cinnamomi*, se disemina de un campo a otro en el agua de riego. Para aislar hongos del suelo se emplea también, un tubo plástico con agujeros laterales lleno con diferentes medios. Estos tubos enterrados en el suelo, permiten al hongo desarrollarse desde el suelo, los tubos se sacan y se aísla el hongo de las áreas cercanas a los agujeros. Esta técnica es sumamente valiosa para el estudio de oomicetes y hongos cuyos micelios avanzan por el suelo.

El empleo del hospedero como trampas para aislar hongos patógenos habitantes del suelo, así por ejemplo se puede plantar hospederos susceptibles y mantenerlo en condiciones ambientales favorables para la infección. Una vez que hay infección en las raíces o en el hipocótilo se saca la planta y el patógeno puede ser aislado fácilmente por ejemplo emplear tallos de frijol para aislar *Rhizoctonia solani*.

3.4. Aislamiento por dilución de esporas Para hongos del suelo y parásitos obligados.

Las técnicas de dilución favorecen el aislamiento de organismos que producen grandes cantidades de esporas, como los penicilios, los aspergilos, las levaduras y muchos *Actinomycetes*. Esta técnica de dilución es una de las más antiguas para el estudio de los hongos del suelo. Se procede en la forma siguiente: a una cantidad conocida de suelo se añade agua estéril y a continuación se hace una serie de diluciones. Alícuotas de la suspensión de la serie de diluciones se depositan sobre la superficie de diversos medios de cultivo.

En el caso de que se desee saber solamente la cantidad total de la mayor parte de los tipos de hongos presentes en el suelo se puede usar un medio como PDA. Sin embargo si se quiere estudiar solo ciertas especies o grupos deben usarse medios selectivos. Así por ejemplo: Snyder *et al* han usado un medio que contiene sales minerales, rosa de bengala, sales de Na y estreptomina para el aislamiento selectivo de *Fusarium solani* f. sp phaseolis. Para otros hongos, otros compuestos químicos son empleados para inhibir selectivamente bacterias y hongos, por lo cual el medio llega a ser sumamente complejo.

Técnicas de Laboratorio

3.5. Inoculación del hospedero

Se emplea para parásitos obligados y casos difíciles, cuando el material enfermo está sumamente contaminado, la inoculación directa del hospedero puede ser el método más rápido para aislar al patógeno.

3.6. Método de dilución del suelo

1. Remover el suelo pesar 10 g poner en 90 ml H₂O estéril. Se deja su reposo 5 min (dilución 1:10⁻²).
2. 1 ml de la dilución 10⁻² se transfiere asépticamente al tubo con 9 ml de agua estéril (10⁻³). Se mezcla bien el inóculo golpeando el tubo con el dedo índice.
3. De manera analógica se transfiere al tercer tubo hasta la dilución 10⁻⁷.
4. De cada dilución 10⁻³ y 10⁻⁵ sembrar 0.2 ml con medio PDA y AN se distribuye por toda la superficie con espátula Drigalski.
5. Incuba a temperatura 25 a 28°C

El número de los microorganismos en 1 g del suelo se determina por la cantidad de colonias que crecen en la placa ejemplo: hemos sembrado 0.2 ml de la dilución 10⁻³ han crecido 5 colonias. Entonces en 1 g de suelo va encontrarse.

$$\text{UFC: } \frac{\text{Número de colonias} \times \text{dilución}}{0.2} = \text{Total UFC} \times \text{g de suelo}$$

Número de colonias: Total de colonias formadas en cada plato petri.

Dilución: Cifra correspondiente a la dilución dada (10⁻³ y 10⁻⁵)

0.2: ml de dilución sembrada en cada plato petri.

3.7. Cultivo monospórico

Una vez aislado el patógeno causante de una enfermedad, se requiere de grupos de individuos que representen la población del patógeno. Para esto deben obtenerse cultivos puros generados de una sola espora.

Se hace una suspensión de baja concentración de conidios en agua estéril de la especie en estudio a partir del cultivo inicial. En 0.5 ml de dicha suspensión verter en una caja Petri con medio agar agua y dispersarla con una varilla de vidrio estéril observar la germinación de las conidias bajo el estereoscopio a intervalos de tiempo (24,48 y 72 horas). Cuando estos inicien su germinación, con una aguja

previamente esterilizada a la flama, ubicar los conidios que germinan en forma aislada y tomar el pedacito del agar donde se encuentran estos y transferir uno por uno los conidios a cajas Petri individuales. Usar el medio selectivo recomendado para el crecimiento del patógeno en estudio. Observar el crecimiento de cada colonia obtenida y descartar aquellas que muestren un crecimiento concéntrico doble o triple, ya que este patrón indica más de una espora durante la transferencia al cultivo selectivo.

3.8. Medio de harinas de maíz mas antibióticos (PARC)

Harina de maíz 60 g

Agar 12 g

Agua 1 000 ml

10 mg/L Pimaricina (20 de 50% i.a.)

10 mg/L Rifampicina (100% i.a.)

250 mg/L Ampicilina (100% i.a.)

Anexo 4. Técnicas de aislamiento de bacterias

4.1. Dilución en Serie

Corte trozos pequeños de tejido enfermo de aproximadamente 5 mm de largo, sumérgalos durante dos minutos en cloro o hipoclorito de sodio al 0.5%, enjuague en agua destilada estéril por un minuto y deposite 10 trocitos en un tubo de ensayo que contenga 5 ml de agua estéril; tape el tubo y manténgalo en reposo durante 15 minutos. Prepare 3 tubos de ensayo conteniendo cada uno 9 ml de agua destilada estéril (ADE). Enumérelos.

Mediante una pipeta estéril deposite 1 ml del primer tubo (trocitos tejido vegetal), al segundo tubo, agite nuevamente, y de este, pase 1 ml al tercer tubo para obtener finalmente diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, respectivamente. Agregue por separado 0.5 ml de cada dilución por caja Petri esterilizada. Agregue aproximadamente 20 ml de AN a cada caja y agite suavemente para distribuir las bacterias a través del medio. Coloque las cajas sobre una mesa limpia del laboratorio. Las colonias aparecerán 48-72 horas más tarde, siendo la concentración de éstas proporcional a la dilución empleada. Se considera que cada colonia proviene de una célula bacteriana. *Xanthomonas* produce en AN colonias de color amarillo.

Las colonias provenientes de tejido vegetal enfermo con bacterias fitopatógenas de tomate o chile atacados por *Pseudomonas solanacearum* se deben transferir a cajas petri con medio KB. Sobre éste medio *Pseudomonas* produce un pigmento

Técnicas de Laboratorio

fluorescente de color verdoso-amarillento, el cual es fácil de observar bajo la luz ultravioleta.

4.2. Rayado bacteriano

Como el método anterior, corte trozos pequeños de aproximadamente 5 mm de tejidos afectados por *Xanthomonas campestris*, colóquelos durante 2 minutos en hipoclorito de sodio al 0.5%, enjuáguelos en ADE. Deje reposar por unos 10-15 minutos (observe el flujo de bacterias de color lechoso) y con una asa estéril transfiera una suspensión de bacterias a cajas Petri con nutriente-glucosa-agar (NGA). Se transfiere haciendo rayados paralelos de lado a lado de la caja sobre la superficie del medio.

Coloque las cajas a temperatura ambiente. Las colonias aparecerán 48-72 horas más tarde. *Xanthomonas* produce colonias de color amarillo.

4.3. Prueba de patogenicidad

Esta es la prueba más importante para definir si el cultivo puro obtenido corresponde a una especie de bacteria patogénica. Usar plantas jóvenes de la variedad del cultivo en el que se haya observado la lesión, inocular una suspensión concentrada de bacterias, derivada de un cultivo puro joven. Se filtra la suspensión bacteriana en la hoja. Incubar las plantas una semana en una cámara húmeda. Si se reproducen lesiones extendidas similares a los síntomas observados en el campo, es seguro que es patogénica, pero hay que aislar nuevamente la bacteria, para verificar los postulados de Koch.

Anexo 5. Técnicas de extracción de nematodos

5.1. Extracción de nematodos del suelo

5.1.1. Tamices más filtro de algodón

Esta técnica constituye una modificación de la técnica de extracción de Embudos de Baerman. Es usado para coleccionar nematodos activos y está basada principalmente en el movimiento de los nematodos. A continuación se explica el procedimiento a seguir:

1. Se toma 1 kilo de suelo que corresponde a la muestra obtenida en el campo, se homogeniza y tamiza para descartar terrones y residuos vegetales.
2. Del suelo tamizado se toman 200 g de suelo, los cuales se ponen en un pichel con 1 litro de agua y se agita hasta desbaratar el suelo.
3. La suspensión se deja reposar por 30 segundos y el sobrenadante se decanta cuidadosamente sobre los cuatro tamices, los cuales han sido

colocados en orden ascendente de la siguiente manera: 0.045, 0.100, 0.250 y 0.425 mm de diámetro.

4. El suelo que queda asentado en el pichel se le vuelve a echar agua, un litro, repitiendo la operación anterior una vez más.
5. Con un poco de agua, proveniente de una manguera, se lavan los residuos que han quedado en los tamices de mayor diámetro (0.425 y 0.250 mm), los que posterior a esto se descartan.
6. El suelo que quedó en los tamices de menor diámetro (0.045 y 0.100), es lavado con una pizeta y depositado directamente en el tamiz de extracción al que previamente se le ha colocado el papel filtro.
7. Finalmente el tamiz de extracción es colocado en un plato de extracción el cual contiene 100 cc de agua. El tamiz de extracción se dejará reposar por 24 horas.
8. Pasadas las 24 horas se toma del plato de extracción la solución con nematodos, la cual se deposita en un beaker, y se procede observar la muestra en el microscopio, para la identificación y conteo de los nematodos.

4.1.2. Centrifugación-Flotación

Esta técnica se basa en el peso específico de los nematodos, la cual se detalla el procedimiento

1. Seguir los pasos del 1 al 5 descrito en el método de Tamices más filtro de algodón.
2. El suelo que quedó en los tamices de menor diámetro (0.045 y 0.100), es lavado con una pizeta y depositado directamente en el tubo de la centrifuga.
3. El vaso de la centrifuga es pesado para conocer su peso y a partir de este peso se debe procurar (es mandatorio) que todos los vasos con las muestras de suelo pesen lo mismo para no afectar el balance de la centrifuga.
4. Una vez asegurado que todos los vasos pesen lo mismo se centrifugan a 2000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos. En este punto se observarán una fase sólida (el suelo con los nematodos) y una líquida (el agua) la cual debe ser decantada.
5. Al tubo con el suelo se le agrega la solución azucarada con una densidad específica la densidad que poseen los nematodos. Se homogeniza bien la solución y se procede a pesar nuevamente el tubo. Todos los vasos de la centrifuga deben pesar lo mismo.
6. Centrifugar los vasos a 2000 rpm por 2 minutos.

Técnicas de Laboratorio

7. Igual que en el paso 4 se observarán las mismas dos fases. Esta vez la fase líquida se verterá sobre el tamiz de 0.045 mm de diámetro, se lavará con cuidado y con abundante agua.
8. Con la piceta se lavará el tamiz y la solución con los nematodos será vertida en un beaker.
9. Observar la solución obtenida en el microscopio inmediatamente.

5.2. Extracción de Nematodos de Material Vegetal

5.2.1. Licuadora más tamices más filtros de algodón.

Paralelamente al grupo de nematodos ectoparásitos (nematodos que se alimentan externamente de las raíces), existe el grupo de nematodos endoparásitos (nematodos que viven y se alimentan dentro del tejido vegetal). Para la extracción de este grupo de nematodos se utiliza la técnica de maceración de raíces mediante la utilización de una licuadora.

El principio de este método es igual que el anterior, la movilidad de los nematodos. A continuación se describen los pasos a seguir:

1. El material vegetal infectado por nematodos (raíces, tallos, hojas, granos, etc), se lava en el chorro de la llave de agua, con el propósito de eliminar suelo y otras partículas.
2. Una vez lavadas se secan con papel toalla y se cortan en trocitos de aproximadamente uno o dos centímetros de largo, en el caso de raíces, hojas y tallos.
3. El material a procesar debe ser pesado, todas las muestras deben tener el mismo peso. (p.e: 3,5, 10 g).
4. Colocar el material vegetal en la licuadora a la que previamente se le han puesto 100 cc de agua y se licúa por 30 segundos. El tiempo de licuado va a depender del tipo de raíces y género de nematodos.
5. Decantar la solución obtenida sobre los tamices (0.045, 0.100, 0.250 y 0.425 mm), lavar los tamices de mayor diámetro y recoger en un beaker los residuos de los tamices de menor diámetro de poro.
6. Depositar la solución obtenida en el tamiz de extracción con el papel filtro y colocarlo en el plato de extracción con 100 ml de agua. Dejarlo reposar por 24 horas.
7. Observar la solución obtenida en el microscopio para la identificación y conteo de los nematodos.

Técnicas de Laboratorio

5.2.2. Método de Incubación o Humificador

Esta técnica se utiliza para nematodos endoparásitos, tales como *Meloidogyne* sp. con el fin de incubar los huevos en estado embrionario y el juvenil 1 así como los estados juveniles 2 que se encuentran aún en el matriz gelatinosa. Las raíces serán colocadas en los recipientes y permanecerán en el humificador por 72 horas. Cada 24 horas se harán observaciones en el microscopio para el conteo de las poblaciones. Las raíces deben ser lavadas cuidadosamente, secadas y luego se deben pesar.

Anexo 6. Evaluación de sanidad de la semilla

1. Técnica de siembra de inducción a la esporulación (Prueba de agar)

Utilice 5 platos con agar agua (AA) al 2%. Tome 50 semillas por cultivo, trátelas con hipoclorito de sodio durante 2 minutos, séquelas en papel filtro y posteriormente siembre 10 semillas por plato de tal manera que queden bien distribuidas e incube a 20-25 grados centígrados durante 4 a 8 días. Haga observaciones frecuentes tomando registro de germinación y número de semillas que presentan hongos, bacterias o ambos. Las bacterias se transfieren a los tubos de ensayo con NGA-CaCO₃ y los hongos a tubos de ensayo con V-8 agar-ácido láctico para identificación posterior y pruebas de patogenicidad.

2. Prueba en papel filtro

Esta prueba es una modificación de la prueba de germinación ya que la semilla se coloca sobre la superficie de discos de papel filtro humedecido. Los discos de papel se saturan con agua estéril y el exceso se elimina. Como en el método anterior tome 50 semillas por cultivo; trátelas con hipoclorito de sodio durante 2 minutos y luego coloque 10 semillas por plato Petri. Ya que con éste método el crecimiento de plántulas con frecuencia dificulta la observación de hongos, y la determinación del porcentaje de infección es imposible, adicione unas 5 gotas de 2,4-D al 0.2% por cada plato con el fin de prevenir la germinación de la semilla. Las cajas así tratadas se sellan con tiras de papel parafilm y se ponen a incubar a 20-25 grados centígrados con un ciclo de luz ultravioleta (LU) de 12 horas diarias durante 4-8 días, como en el método anterior, tome registros del número de semillas que presentan hongos o bacterias, o ambos. Identifíquelos

Anexo 7. Técnicas ELISAS, para detección de Virus fitopatógeno

El uso del test ELISA, es usada para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos a las paredes de una placa de plástico (poliestireno), a la que posteriormente se le agregará extractos de savia de la planta problema. Si el

antígeno está presente en la muestra, estos serán inmovilizados a las paredes de la placa. Un segundo anticuerpo unido covalentemente a una enzima que reconoce el antígeno inmovilizado es agregado posteriormente. La presencia en cada pocillo de la placa del complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo +enzima es revelado por el cambio de color que ocurre al aplicar un sustrato cromogénico que es utilizado por la enzima conjugada al segundo anticuerpo. El cambio de color y por lo tanto la presencia del antígeno, es cuantificado por medio de la medición de absorbancia que es efectuado por un lector de placa ELISA. Existen variantes:

7.1. ELISA Directo

La forma más simple. Detecta un antígeno que se ha unido a una fase sólida (placa poliestireno). Un anticuerpo conjugado con una enzima es incubado con el antígeno capturado y después de lavar el exceso del conjugado se agrega el sustrato cromogénico. El viraje a un color determinado indicará un interacción específica antígeno-anticuerpo.

7.2. ELISA Indirecto

El antígeno es primero absorbido a la placa, entonces actúa un anticuerpo secundario y posteriormente el anticuerpo conjugado a la enzima. Para que se desarrolle color, el anticuerpo primario que es específico para el antígeno debe estar presente en el complejo final.

7.3. ELISA Sándwich

En este caso un anticuerpo es absorbido a la placa con el objetivo de capturar el antígeno. Un segundo anticuerpo conjugado, es utilizado después de agregar la muestra con el antígeno de interés. De esta forma se obtiene el viraje del color del sustrato que indica la presencia del antígeno en la muestra. Esta forma es considerada la más específica y sensible de las metodologías de ELISA.

7.4. Inmuno impresión de tejidos

Se utiliza en reacciones específicas antígeno-anticuerpo es similar a la placa ELISA, con la excepción que en este caso la matriz sólida es una pieza especial, membrana. Con esta técnicas, la localización del patógeno o agente causal de la enfermedad puede ser determinad dentro del tejido del hospedero. El tejido de la planta es presionado contra una membrana (nitrocelulosa o nylon) a la que después se le unirán los anticuerpos que se unen específicamente al patógeno. Un cambio de color indicará un resultado positivo y mostrará la localización del patógeno en el tejido del hospedero

7.5. Test de flujo lateral

En esta prueba un anticuerpo, específico para el antígeno blanco (patógeno) es inmovilizado en una fase sólida (membrana de nitrocelulosa). Un segundo anticuerpo conjugado a otro colooidal, que también reconoce al antígeno blanco, es depositado sobre esta membrana. Cuando la muestra que contiene el antígeno es aplicada a la membrana, esta migra a través del conjugado solubilizándolo y formando un complejo que se mueve a través de la membrana. Este complejo es atrapado al alcanzar el anticuerpo que está inmovilizado en la matriz, formándose un sándwich, entre los dos anticuerpos y el antígeno. Además, se desarrolla un color que refleja la concentración del antígeno en la muestra. La mayoría de los test de flujo lateral también contienen una línea control que asegura la ejecución y funcionamiento correcto de la prueba.

7.6. Protocolo ELISA

1. Realizar macerado del material vegetativo
2. Adicionar 100 μ l de control(+) muestras y buffer a cada pozo correspondiente e incubar pro 2 horas
3. Lavar con PBST (1X) 4-8 veces y secar
4. Adicionar 100 μ l de la enzima conjugada e incubar por 2 horas
5. Lavar con PBST (1X) 4-8 veces y secar
6. Adicionar 100 μ l de PNP e incubar por 30 a 60 min en cámara húmeda
7. Adicionar 50 μ l de solución stop
8. Realizar lectura del protocolo (visual o fotométrica)

7.7. Preparación de soluciones

1. Preparación PBST 1X

(20) (?) = (1 X) (100ml)

X=5 ml PBS

95 ml de H₂O

2. Diluir 3.33 Buffer de extracción en 10 ml PBST

3. Dilución muestra

900 μ l Buffer

100 μ l solución macerada

Anexo 8 Organización y principios de trabajo de laboratorio con técnicas moleculares

8.1. Uso correcto de micropipetas

- Seleccionar la micropipeta correcta de acuerdo al trabajo
- Ajustar el volumen
- Colocar una punta en la micropipeta sin tocar la punta
- Presiones el émbolo hasta el primer punto de resistencia
- Colocar la punta debajo de la superficie del líquido
- Lentamente libere el émbolo
- Colocar la punta cerca del fondo del tubo
- Lentamente presione el émbolo para que pase el primer punto de la resistencia hasta el segundo punto de resistencia
- Libere el émbolo DESPUES de que la punta es removida del tubo
- Elimina la punta en el contenedor de descarte

8.2. Preparación de geles de agarosa

- Pesar la cantidad apropiada de agarosa de acuerdo a la concentración y volumen requerido
- Calentarlo en microondas hasta disolver aproximadamente 2 min
- Añada el volumen requerido de bromuro de ethidium (1 %) o Gel Red, agitar
- Dispensar el gel en una cámara de electroforesis de acuerdo con el número de muestras que colocará
- Sumerja el peine y alinearlo
- Permitir que el Ges se solidifique y retirar el peine
- Colocar en la base de la cámara y llenarla con la solución buffer

Tabla 2. Preparación de Cantidad de agarosa de acuerdo a la capacidad de La cámara

Capacidad de cámara	Cantidad de agarosa para 1 % (g)	Cantidad de agarosa para 1.6 % (g)	Cantidad de agarosa para 2.6 % (g)
150ml	1,5	2,4	3,9
100ml	1	1,6	2,4
50ml	0.5	0.8	1,6

8.3.Preparación de soluciones

1. Buffer de Extracción para 100 ml
100 ml Tris.HCl (1 M) pH 8.0
2,5 ml EDTA (0,5 M)
5 ml NaCl (5M)
2. Buffer de Extracción CTAB
Para 100ml
2 g de CTAB ($C_{19}H_{42}NBr$)
5 ml EDTA (0,5 M)
28 ml NaCl (5M)
3. Buffer TE (Tris-EDTA) pH 7,4
500 ml
0,605 g Trizma Based (10mM=
0,185 g EDTA (1mM)
Autoclavar
4. EDTA 0,5 pH 8.0 500 ml
93,0 g EDTA
5. Tris-HCL 1M pH 8,0 100 ml
12,11 g de Trizma Base
Autoclavar
6. NaCl 5 M 100 ml
29,2 g NaCl
Autoclavar
7. NaOAc 3 M (pH 5.2) 100 ml
13 g NaOAc en 10
Autoclavar
8. CTAB 10 % 50 ml
5 g CTAB
9. SDS 10 % 100ml
10 g SDS
10. Buffer TBE 5 X IL
Tris-Base 54 g
Ácido Bórico 27,5 g
EDTA 3,72 g
pH 8,13-8,23